

Molekulare Marker in der Krebsvorsorge: Entwicklung eines Sandwich-ELISA zum Nachweis des humanen Papillomavirus Typ 45 Onkoprotein E7 und funktionelle Charakterisierung des Transmembranproteins TSPAN1/NET-1 hinsichtlich seiner Rolle bei der Entwicklung des Zervixkarzinoms.

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Ing. (FH) Sebastian Hölters
geboren am 25.10.1980 in Gotha

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst

Gynäkologische Molekularbiologie, Universitätsklinikum Jena, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Prof. Dr. rer. nat. Claus Liebmann

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Zentrum für Molekulare Biomedizin, Institut für Biochemie und Biophysik

Prof. Dr. rer. nat. Helmut Deißler

Molekulargenetische Diagnostik und Molekulare Onkologie, Universitätsfrauenklinik Ulm

Tag der Verteidigung:

02.07.2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VIII |
| Tabellenverzeichnis | XV |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Humane Papillomaviren | 1 |
| 1.2 Das Zervixkarzinom | 2 |
| 1.3 HPV induzierte Zervixkarzinogenese durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 | 5 |
| 1.4 Derzeitige Zervixkarzinomvorsorge | 6 |
| 1.5 Die Transmembran 4 Superfamilie (TM4SF), Tetraspanine | 7 |
| 1.5.1 Struktur und Funktion von Tetraspaninen | 8 |
| 1.5.2 Beteiligung von Tetraspaninen an der Signalweiterleitung | 11 |
| 1.5.3 Die Rolle der Tetraspanine bei Krebserkrankungen | 14 |
| 1.5.4 Tetraspanin 1 (Tspan1, NET-1) | 15 |
| 1.6 Regulation der Zellbeweglichkeit und -proliferation durch Signaltransduktion | 16 |
| 1.6.1 Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion über den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) | 16 |
| 1.6.2 Integrin-vermittelte Signaltransduktion, Integrin „ <i>outside-in signaling</i> “ | 18 |
| 1.6.3 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) | 21 |
| 2 Zielstellung | 22 |
| 3 Material | 23 |
| 3.1 Puffer und Lösungen | 23 |
| 3.1.1 Arbeiten in der Zellkultur | 23 |
| 3.1.2 Invasions Assay | 24 |
| 3.1.3 Proliferations und Kolonie Formations Assay | 25 |
| 3.1.4 Adhäsions Assay | 25 |
| 3.1.5 Stimulationsversuche | 26 |
| 3.1.6 Aufreinigung und Modifizierung monoklonaler Antikörper | 27 |
| 3.1.7 SDS-PAGE | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.1.8 | <i>Western blot</i> | 30 |
| 3.1.9 | Immundetektion und Immunzytochemie- und -histochemie | 30 |
| 3.1.10 | <i>Sandwich</i> -ELISA zum Nachweis von HPV45 E7 | 33 |
| 3.2 | Chemikalien und Materialien | 34 |
| 4 | Methoden | 36 |
| 4.1 | Arbeiten mit Zellkulturen | 36 |
| 4.1.1 | Auftauen einer Kryokonserven | 36 |
| 4.1.2 | Kultivierung von Zelllinien | 36 |
| 4.1.3 | Anlegen von Kryokonserven | 37 |
| 4.1.4 | Zellzahlbestimmung | 37 |
| 4.1.5 | Gentransfer mittels Transfektion | 37 |
| 4.1.6 | Gentransfer mittels Adenoviren | 37 |
| 4.1.7 | Invasions Assay | 38 |
| 4.1.8 | Proliferations Assay | 38 |
| 4.1.9 | Kolonie Formations Assay | 39 |
| 4.1.10 | Adhäsions Assay | 40 |
| 4.1.11 | Stimulationsversuche mit EGF und ECM Proteinen | 40 |
| 4.2 | Aufreinigung und Modifizierung monoklonaler Antikörper | 41 |
| 4.2.1 | Identifizierung Antikörper produzierender Hybridome | 42 |
| 4.2.2 | Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturmedium . . | 43 |
| 4.2.3 | Isotypisierung monoklonaler Antikörper | 43 |
| 4.2.4 | Antikörpermodifikation (Biotin- und Peroxidase- Konjugation . . | 43 |
| 4.2.5 | Identifizierung des optimalen Antikörper-Paares für den <i>Sand-</i> <i>wich</i> -ELISA | 45 |
| 4.3 | Arbeiten zum Nachweis von Proteinen | 46 |
| 4.3.1 | Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS- PAGE) | 46 |
| 4.3.2 | <i>Western Blot</i> | 46 |
| 4.3.3 | Immundetektion | 46 |
| 4.3.4 | Immunzytochemie und -histochemie | 47 |
| 4.3.5 | <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i> (ELISA) zum Nachweis von HPV45 E7 | 48 |
| 4.4 | Analyse der Expression von Matrix Metalloproteinasen | 49 |
| 4.5 | Statistische Auswertung | 50 |
| 5 | Ergebnisse | 51 |
| 5.1 | ELISA zum Nachweis des HPV45 Onkoproteins E7 | 51 |
| 5.1.1 | Generierung monoklonaler Antikörper gegen HPV45 E7 | 51 |

| | | |
|----------|--|-------------|
| 5.1.2 | Entwicklung eines <i>Sandwich</i> -ELISA zum Nachweis von HPV45 E7 | 53 |
| 5.1.3 | Validierung des HPV45 E7 <i>Sandwich</i> -ELISA mittels zervikalen Abstrichproben | 56 |
| 5.2 | Die Rolle von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom | 60 |
| 5.2.1 | Tetraspanin 1 wird in Bereichen des Zervixkarzinoms exprimiert welche potentiell eine erhöhte Proliferation und/oder Zellbeweglichkeit aufweisen | 60 |
| 5.2.2 | Tetraspanin 1 steigert die Invasivität von Zervixkarzinomzellen . . | 60 |
| 5.2.3 | Die Zell-Matrix-Interaktion von Zervixkarzinomzellen wird nicht durch Tetraspanin 1 beeinflusst | 63 |
| 5.2.4 | Tetraspanin 1 hat keinen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Signaltransduktion | 64 |
| 5.2.5 | Tetraspanin 1 reduziert potentiell die Expression der Matrix Metalloproteinase 14 | 66 |
| 5.2.6 | Die <i>in vitro</i> Zellproliferation von Zervixkarzinomzellen bleibt unbeeinträchtigt durch Tetraspanin 1 | 67 |
| 5.2.7 | Tetraspanin 1 hat keinen Einfluss auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion | 69 |
| 6 | Diskussion | 71 |
| 6.1 | Entwicklung eines <i>Sandwich</i> -ELISA zum Nachweis des HPV45 Onkogen E7 | 71 |
| 6.2 | Die Rolle von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom | 74 |
| 7 | Ausblick | 81 |
| 8 | Zusammenfassung | 83 |
| 9 | Abstract | 85 |
| | Literaturverzeichnis | XVII |
| | Danksagung | |
| | Ehrenwörtliche Erklärung | |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|--------------------|-------|--|
| Akt | | siehe PKB |
| AP-3 | | Adapter Protein-3 |
| AP | | Alkalische Phosphatase |
| APS | | Ammoniumpersulfat |
| bp | | Basenpaar |
| BSA | | Bovines Serum Albumin |
| cdc42 | | <i>cell division control protein 42 homolog</i> |
| Cdk | | Cyclin-abhängige Kinase, <i>cycline-dependent kinase</i> |
| CDKN2A, p16Ink4a | .. | Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CIN | | zervikale intraepitheliale Neoplasie, <i>cevical intraepithelial neoplasia</i> |
| CRK, CRKII | | <i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)</i> |
| ddH ₂ O | | doppelt destilliertes Wasser |
| DMEM | | <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | | Dimethylsulfoxid |
| DOCK180 | | <i>Dedicator of cytokinesis180</i> |
| DTT | | Dithiothreitol |
| EC1 | | kleine extrazelluläre Domäne eines Tetraspanins |
| EC2 | | große extrazelluläre Domäne eines Tetraspanins |
| ECM | | Extrazelluläre Matrix, <i>extra cellular matrix</i> |
| EDTA | | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | | Epidermaler Wachstums Faktor, <i>epidermal growth factor</i> |
| EGFR | | Epidermaler Wachstums Faktor Rezeptor, <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EGTA | | Ethylenglycoltetraessigsäure, <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> |
| ELISA | | <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> |
| Eph-RTK | | Ephrin-Rezeptor Tyrosin Kinase |
| Erk1/2 | | <i>extracellular signal-related kinases 1/2</i> |
| ERM | | Ezrin-Radixin-Moesin |
| EWI-2 | | Pseudonym für <i>immunoglobulin superfamily, member 8</i> |
| EWI-2 | | Pseudonym für <i>prostaglandin F2 receptor negative regulator</i> |
| FAK | | <i>focal adhesion kinase</i> |
| FKS | | Fetales Kälber Serum |
| FPLC | | <i>fast protein liquid chromatography</i> |
| GDP | | Guanosindiphosphat |
| Grb2 | | <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> |
| GST | | Glutathion-S-Transferase |

| | |
|-------------------------------------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H ₂ SO ₄ | Schwefelsäure |
| HAT | Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine |
| Her2/ErbB2/neu | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| Her3/ErbB3 | <i>human epidermal growth factor receptor 3</i> |
| Her4/ErbB4 | <i>human epidermal growth factor receptor 4</i> |
| HGFR | Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor, <i>hepatocyte growth factor receptor</i> |
| HNSCC | <i>human head and neck squamous cell carcinoma</i> |
| HPV | Humanes Papillomavirus |
| HR-HPV | <i>high risk</i> Humanes Papillomavirus |
| HRP | Meerrettichperoxidase, <i>horse raddish peroxidase</i> |
| hTHTR-1 | humaner Thiamin Transporter-1 |
| ID | Immundetektion |
| IgG | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| IZC | Immunzytochemie |
| JAK | Janus Kinase |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| KAl (SO ₄) ₂ | Kaliumaluminiumsulfat |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | kilo Dalton |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| KIO ₃ | Kaliumiodat |
| LCR | <i>long control region</i> |
| LR-HPV | <i>low risk</i> Humanes Papillomavirus |
| m/v | Masse/Volumen |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| ME491 | <i>melanoma-associated antigen</i> |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MIT | 2-Methyl-4-isothiazolin-3-on Hydrochlorid |
| mM | mili Molar |
| MMP | Matrix Metalloproteinase |
| mRNA | <i>messenger</i> Ribonukleinsäure |
| MRP-1 | <i>motility-related protein-1</i> |
| MT1-MMP | Membran-Typ 1 Matrix Metalloproteinase |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| n.a. | nicht analysiert |
| n.d. | nicht durchgeführt |

| | |
|--|---|
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| NaBH ₄ | Natriumborhydrit |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaIO ₄ | Natriumperiodat |
| NP-40 | Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol 40 |
| p130Cas | p130 <i>Crk-associated substrate</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3 Kinase |
| PI4K | Phosphatidylinositol 4-Kinase |
| PKB | Protein Kinase B |
| PKC | Protein Kinase C |
| pRB | Retinoblastom-Protein |
| PtdIns(4,5)P ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PtdIns | Phosphatidylinositide |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| Rac | <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i> |
| Raf1 | <i>Rat fibrosarcoma-1</i> |
| Ral | <i>Ras-related protein</i> |
| Ras | <i>Rat sarcoma</i> |
| RBD | Ras-Binde-Domäne |
| RDS | <i>retinal degeneration slow</i> |
| Rho | <i>Ras homolog gene family</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i> |
| ROM1 | <i>retinal outer segment membrane protein 1</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RTK | Rezeptor Tyrosinkinase |
| SAPK | Stress-aktivierte Protein Kinase |
| SDS-PAGE | Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese |
| SDS | Natriumdodecylsulfat, <i>Sodiumdodecylsulfat</i> |
| SGP | Sammelgelpuffer |
| Shc | <i>Src homology 2 domain containing</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SOS | <i>Son of Sevenless homologs</i> |
| Src | Akronym von <i>sarcoma</i> |
| STAT1 | <i>signal transducers and activators of transcription 1</i> |
| STAT3 | <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> |

| | |
|---------------------|--|
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| TAPA-1 | <i>target of an antiproliferative antibody-1</i> |
| TEMED | N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamin |
| TEM | <i>tetraspanin enriched microdomain</i> |
| TGF- α | Transformierender Wachstums Faktor- α , <i>transforming growth factor-α</i> |
| TGP | Trenngelpuffer |
| TIMP | <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> |
| TM4SF | Transmembran 4 Superfamilie |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol |
| URR | <i>upstream regulatory region</i> |
| v/v | Volumen/Volumen |

Abbildungsverzeichnis

- 1 **Das HPV Genom am Beispiel des *high risk* HPV31.** Dargestellt sind die „*upstream regulatory region*“ (URR), welche regulatorische Sequenzen für die virale Replikation und Transkription enthält, die Leserahmen der frühen Gene (E, *early*) mit ihrem Promoter P₉₇ sowie der späten Gene (L, *late*), sowie der für deren Expression verantwortliche Promotor P₇₄₂ [49]. 1
- 2 **Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms.** A) Diagramm der Raten, pro 100000 Frauen, für die Häufigkeit (rot, *Incidence*) und Sterblichkeit (blau, *Mortality*) des Zervixkarzinoms in verschiedenen Regionen der Erde. B) Weltkarte zur Übersicht der Häufigkeit des Zervixkarzinoms. C) Weltkarte zur Übersicht der Sterberate des Zervixkarzinoms. [185]. 3
- 3 **Entwicklung des Zervixkarzinoms nach Infektion durch humane Papillomaviren.** Dargestellt ist der schematische Verlauf von der Infektion mit HPV bis zur Entwicklung des Zervixkarzinoms. Durch kleine Verletzungen gelangen HPV Partikel an die Zellen der Basalschicht (*Basal layer*) und infizieren diese. Nach Infektion werden die frühen Gene E1, E2 und E4-E7 exprimiert und dadurch die virale Replikation initiiert. In den darauffolgenden Gewebeschichten, der Mittel- und Superfizialzone (*Mid-zone und Superficial zone*) beginnt die Expression der späten Gene L1 und L2 und die Bildung der Viruspartikel, welche dann abgegeben werden und erneut Zellen infizieren können. In den leicht-gradigen Neoplasien findet die Replikation der Viren statt. Aus den leicht-gradigen Neoplasien können sich schwer-gradige Neoplasien entwickeln, was mit einer Integration des Virusgenoms einhergeht, und diese wiederum können sich zu einem Karzinom weiterentwickeln (modifiziert nach [183]). 4

- 4 **Transformation und Immortalisierung durch die Onkoproteine E6 und E7.** Dargestellt ist eine schematische Übersicht wie die viralen Onkoproteine E6 und E7 jeweils in die Regulation des Zellzyklus eingreifen und dadurch permanentes Zellwachstum fördern. Grüne Pfeile bedeuten einen positiven und rote Linien einen negativen Effekt. E6 aktiviert zum einen die Telomerase, was eine Induzierung von Seneszenz bei fortschreitender Zellteilung inhibiert. Weiterhin bewirkt es den Ubiquitinvermittelten Abbau von p53, dadurch verliert die Zelle einen Kontrollmechanismus der den Zellzyklus bei DNA Schäden unterbrechen, sowie Apoptose induzieren kann. E7 vermittelt unter anderem den Ubiquitinvermittelten Abbau von pRB nach dessen Bindung, dabei wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und die Expression proliferationsfördernder Gene induziert. Weiterhin verstärkt E7 die Expression der Cycline A und E und inhibiert die Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren, p21 und p27, was zu einer verstärkten Proliferation der Zelle führt (Literaturnachweise siehe Text). 6
- 5 **Strategie zur Zervixkarzinomvorsorge.** Dargestellt ist der schematische Verlauf von der Infektion mit HPV bis zur Entwicklung des Zervixkarzinoms. Der Nachweis von HPV-DNA liefert eine höhere Sensitivität als die zytologische Untersuchung, allerdings eine geringere Spezifität, was zu einem geringeren positiven Vorhersagewert führt. Der Nachweis von HPV-mRNA verbessert die Erkennung schwer-gradiger Neoplasien. Der Nachweis viraler oder nicht-viraler Proteine die mit der Zervixkarzinogenese in Verbindung stehen, könnten eine weitere Stufe zur Verbesserung der Identifikation von CIN2 und höher ermöglichen (modifiziert nach [183]). 8
- 6 **Schematische Darstellung der Tetraspaninreichen-Mikrodomäne innerhalb der Zellmembran.** Dargestellt ist eine Membran-Mikrodomäne. Sie wird gebildet durch verschiedene Tetraspanine die, zusammen mit zum Beispiel Integrinen und Immunglobulin Superfamilie Proteinen wie EWI-2 und EWI-F, einen Proteinkomplex innerhalb der Zellmembran bilden. Intrazelluläre Bindungspartner sind verschiedene Adapterproteine (AP), Mitglieder der Aktin bindenden Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteinfamilie, der Typ II Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4KII) oder Protein Kinase C (PKC) sowie andere Proteine mit einer PDZ-Domäne für Protein-Protein Interaktionen [160]. 9

- 7 **Schematische Darstellung der Tetraspanin Struktur.** A) Dargestellt ist die Gesamtstruktur eines Tetraspanins mit den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini sowie der kleinen intrazellulären Domäne, sowie den vier Palmitoylierungsstellen an Cysteinen nahe der Zellmembran (*Palmitates*). Weiterhin sind die vier Transmembrandomänen inklusive der, innerhalb der Tetraspanin Familie, konservierten Aminosäuren Asparagin (in Transmembrandomäne 1) und Glutamin oder Glutaminsäure (in den Transmembrandomänen 3 und 4) durch die roten Ovale dargestellt. Auf der extrazellulären Seite liegen die kleine extrazelluläre Domäne (EC1), sowie die große extrazelluläre Domäne (EC2). EC2 ist unterteilt in eine konstante Region (gelb), bestehend aus den drei α -Helices A, B und E (graue Säulen), und einer variablen Region (blau). Innerhalb der variablen Region liegen die zwei α -Helices C und D (nicht dargestellt). Hinter der α -Helix B liegt das für Tetraspanine typische, hoch konservierte, Cystein-Cystein-Glycin-Motif (CCG) welches mit zwei weiteren hoch konservierten Cysteinen (gelbe Kreise) zwei Disulfidbrücken (rote Linien) ausbildet. Neben diesen vier konservierten Cysteinen können Tetraspanine noch zwei (grüne Kreise) bis vier (nicht dargestellt) weitere Cysteine besitzen welche ebenfalls Disulfidbrücken ausbilden können (rote gestrichelte Linie) [59]. B) Dargestellt ist ein Schema der großen extrazellulären Domäne EC2 mit den drei α -Helices A B und E (blaue Säulen) der konstanten Region, und dem CCG-Motif sowie den zwei weiteren konservierten Cysteinen (gelbe Achtecke) in der variablen Region der EC2 mit den entsprechenden Disulfidbrücken (grüne Linien). Neben diesen 4 konservierten Cysteinen können zwei bis vier weitere Cysteine vorkommen (weiße Achtecke), die ebenfalls Disulfidbrücken ausbilden (grüne Linien) [64]. 10

- 8 **Tetraspanine und ihre Beteiligung an der Steuerung zellulärer Prozesse [59].** Schematisch dargestellt sind die Tetraspanine CD9, CD81, CD82 und CD151 und die durch sie beeinflussten Signalwege. CD9 ist an der Signalweiterleitung über das Adapterprotein *Src homology 2 domain containing* Shc zu dem Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Weg, speziell p38, sowie JNK und Caspase 3 beteiligt, was zu veränderter Proliferation und Apoptose der Zelle führt [102]. CD81 bindet und erhöht die Aktivität der Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) und damit die Synthese von Phosphoinositiden (PtdIns), diese rekrutieren Shc an die Zellmembran was in einer weiteren Aktivierung der MAPK Erk1/2 und gesteigerten Proliferation resultiert [21]. CD151 vermindert die Aktivierung von Ras und somit ebenfalls dem MAPK Weg zu Erk1/2 sowie Akt/PKB [137] und könnte dadurch ebenfalls die Zellproliferation und Apoptose modulieren. CD82 beeinflusst, durch Remodulierung des Zytoskeletts, über das Adapterprotein p130 *Crk-associated substrate* (p130CAS) und Rac, die Zellbeweglichkeit [197]. 13
- 9 **Wachstumsfaktor-induzierte Signalweiterleitung über den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR).** Über den, durch EGF, aktivierten Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Dargestellt sind die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg über Ras, welcher die Zellproliferation reguliert, sowie der für das Zellüberleben wichtige Signalweg der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K). Weiterhin kann über den EGFR die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Familie erfolgen (Literaturnachweise siehe Text). 17
- 10 **Regulation von Zellproliferation und -überleben sowie Zellbeweglichkeit durch die Integrin „outside-in“ Signalweiterleitung.** Durch Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix wird die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung zu verschiedenen intrazellulären Signalwegen initiiert. Dargestellt sind die Regulation des Zytoskeletts durch GTPasen der *Ras homolog gene family* (Rho) Familie über die *focal adhesion kinase* (FAK) sowie der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), welche ebenfalls über die Protein Kinase B (Akt/PKB) das Zellüberleben reguliert. Weiterhin wird über Integrine die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweges gesteuert, welcher die Zellproliferation reguliert (Literaturnachweise siehe Text). 19

- 11 **HPV45 E7 wird mittels des *Sandwich*-ELISA aus Lysaten der Zervixkarzinom Zelllinie MS751 nachgewiesen.** Die Gesamtzellzahl jeder Probe beträgt 10^5 Zellen, die jeweils 5000 Zellen der jeweiligen HPV-positiven Zelllinien wurden mit C33A Zellen aufgefüllt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus der HPV45 positiven Zervixkarzinom Zelllinie MS751 im Hintergrund HPV-negativer C33A Zervixkarzinom Zellen detektiert werden. Als Kontrolle dienten Zellen der Zervixkarzinomzelllinien C33A (HPV-negativ) CaSki (HPV16 positiv) und HeLa (HPV18 positiv). Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein verwendet. 54
- 12 **HPV45 E7 wird mittels des *Sandwich*-ELISA aus Lysaten HPV45 exprimierenden COS-7 Zellen nachgewiesen.** Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus HPV45 exprimierenden COS-7 Zellen detektiert werden. Als Kontrolle dienten mit dem Leervektor transfizierte COS-7 sowie HPV16 und 18 E7 exprimierende COS-7 Zellen. Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein verwendet. Jede Probe aus Zelllysaten entspricht einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen. 55
- 13 **HPV45 E7 wird mittels des *Sandwich*-ELISA aus Lysaten von HPV45 positiven Zervixkarzinomgeweben nachgewiesen.** Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus Biopsiematerial HPV45 positiver Zervixkarzinome nachgewiesen werden, als Kontrolle diente Gewebe von HPV16 positiven Zervixkarzinomen. Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein, sowie die Zervix Karzinom Zelllinie MS751 als Kontrolle verwendet. Jede Probe aus Zelllysaten entspricht einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen und jede Probe aus Biopsiematerial entspricht fünf Schnitten mit je $10\ \mu\text{m}$ Dicke. 56
- 14 **Tetraspanin 1 wird CIN3 und Karzinomen exprimiert.** Die gezeigten Gewebe von zervikalem Normalgewebe, den präkanzerösen Vorstufen CIN1 bis CIN3 sowie Adeno- und Plattenepithelkarzinomen wurden mit Hämatoxilin und Eosin (HE) gefärbt sowie das, infolge einer HPV-Infektion überexprimierte, $\text{p16}^{\text{INK4a}}$ und Tetraspanin 1 immunhistochemisch visualisiert. Die HE-Färbung zeigt eine Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses hin zum Zellkern mit Zunahme des Schweregrades der Neoplasie, hin zum Karzinom. Die Areale der Neoplasien und des Tumorgewebes sind einheitlich positiv für $\text{p16}^{\text{INK4a}}$. Für die Tetraspanin 1 Expression zeigt sich keine Expression in Normalgewebe und CIN1 sowie CIN2, jedoch ein inhomogenes Expressionsmuster in CIN3 und im Adeno- sowie Plattenepithelkarzinom. Dabei scheint Tetraspanin 1 in Zellen der Wachstumsfront neoplastischer Areale exprimiert zu werden. . 61

- 15 **Tetraspanin 1 verstärkt die Invasivität der Zervixkarzinomzelllinie SiHa durch Matrigel.** Dargestellt sind 4 voneinander unabhängige Experimente mit jeweils vier-fach Bestimmung (n=16). Das Tetraspanin 1 sowie eGFP Gen wurde jeweils durch adenoviralen Gentransfer in SiHa Zellen eingebracht (Tetraspanin 1, eGFP), als Kontrolle diente neben den eGFP exprimierenden SiHa die unbehandelten Ausgangszellen (Kontrolle). Tetraspanin 1 exprimierende SiHa zeigten eine Erhöhung der Invasivität im Vergleich zur Kontrolle (p=0,006, Mann-Whitney-Test) sowie zu eGFP exprimierenden SiHa (p=0.067, Mann-Whitney-Test). 62
- 16 **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die Adhäsion an Proteine der Extrazellulären Matrix.** Um mögliche Tetraspanin 1 abhängige Veränderungen im Adhäsionsverhalten zu untersuchen, wurde die Fähigkeit zur Bindung an die extrazellulären Matrix Bestandteile Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III überprüft. Dargestellt sind 4 voneinander unabhängige Experimente mit vier-fach Bestimmung (n=16) für die Ausgangszellen (Kontrolle), eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierende SiHa (Tetraspanin 1). Es wurde keine signifikant veränderte Adhäsion in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt. 63
- 17 **Tetraspanin 1 ist nicht an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt.** Um die Steuerung der erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinom Zellen auf Signaltransduktions-Ebenen zu untersuchen, wurde die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung nach Kontakt zu den extrazelluläre Matrix Komponenten Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III untersucht. Durch Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* wurden die zentralen Signalproteine *focal adhesion kinase* (FAK), Paxillin und Akt sowie ihre phosphorylierten Formen nachgewiesen. Dargestellt ist ein exemplarisches, von drei voneinander unabhängigen, Experimenten, deren Ergebnisse inkonsistent waren. Dies deutet darauf hin das für keines der untersuchten Signalproteine Unterschiede in der Phosphorylierung, in Abhängigkeit von Tetraspanin 1, vorhanden sind. 65
- 18 **Tetraspanin 1 vermindert potentiell die Expression der Matrix Metalloproteinase 14, in der Zervix Karzinom Zelllinie SiHa.** Im Vergleich zu den Ausgangszellen (Kontrolle) und eGFP exprimierenden SiHa (eGFP) konnte eine vermindere MMP14 Protein Expression, sowohl der inaktiven als auch der aktiven Form, in Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa (Tetraspanin 1) festgestellt werden. Dargestellt ist eins von 2 voneinander unabhängigen Experimenten. 66

- 19 **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die adhäsive, *in-vitro* Zellproliferation.** Zur genaueren Untersuchung ob Tetraspanin 1 die Proliferation der Zervixkarzinomzelllinie SiHa beeinflusst wurde nach sechs Stunden mittels MTT-Umsatz indirekt die Proliferation der Zellen bestimmt. Dargestellt sind die normalisierten Daten aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung (n=4) für die Ausgangszellen (Kontrolle) und fünf voneinander unabhängige Experimente mit dreifach- und Doppelbestimmung (n=5) für eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierende SiHa (Tetraspanin 1). Es wurde keine signifikant (Mann-Whitney-Test) veränderte Proliferation in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt. 68
- 20 **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die Kontakt-unabhängige, *in-vitro* Zellproliferation.** Um zu untersuchen ob Tetraspanin 1 die Kontakt-unabhängige Zellproliferation beeinflusst, wurden Kolonie Formations Assays durchgeführt, bei denen die Zellen nicht-adhären in einer Agaroseschicht wachsen. Dargestellt ist ein repräsentatives von 4 voneinander unabhängigen Experimenten mit drei-fach Bestimmung (n=12). Kolonien bildeten sich in 9 von 12 Fällen für die Ausgangszellen (Kontrolle), 6 von 12 bei eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und 8 von 12 bei Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa (Tetraspanin 1), dabei wurden weder Unterschiede in Größe noch in der Anzahl der Kolonien zwischen den drei Gruppen festgestellt. 69
- 21 **Tetraspanin 1 ist nicht an der EGF-vermittelten Signaltransduktion beteiligt.** Um die Ursache der erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinomzellen auf Signaltransduktions-Ebene zu untersuchen, wurde die Signalweiterleitung nach Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) untersucht. Durch Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* wurden der EGF-Rezeptor und Erk1/2 sowie ihre phosphorylierten Formen nachgewiesen. A) SiHa, dargestellt ist ein exemplarisches, von 4 voneinander unabhängigen, Experimenten. Für keines der untersuchten Signalproteine konnten Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen eGFP exprimierenden (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierenden Zellen (Tetraspanin 1) im Verlauf der Stimulation festgestellt werden. B) HeLa, dargestellt ist ein exemplarisches von 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Für keines der untersuchten Signalproteine konnten Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen der Leervektor transfizierten Kontrolle (Leervektor) und Tetraspanin 1 exprimierenden Zellen (Tetraspanin 1) im Verlauf der Stimulation festgestellt werden. 70

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Verwendete Zelllinien. | 23 |
| 2 | Verwendete Plasmide für die Transfektion und adenoviralen Gen-transfer. | 24 |
| 3 | Rezeptur für 10 ml Trenngel für die SDS-PAGE (TGP) Trenngelpuffer, (A/B) Acrylamid/Bisacrylamid Lösung | 29 |
| 4 | Rezeptur für 10 ml Sammelgel für die SDS-PAGE (SGP) Sammelgelpuffer, (A/B) Acrylamid/Bisacrylamid Lösung | 29 |
| 5 | Verwendete kommerzielle Antikörper Alle primären Antikörper wurden 1:1000 in BSA-Blockpuffer verdünnt und für die Immundetektion eingesetzt. Die entsprechenden sekundär Antikörper wurden für die jeweiligen Anwendungen unterschiedlich eingesetzt (jeweilige Konzentrationen siehe entsprechendes Methodenkapitel) | 32 |
| 6 | Im Labor generierte Antikörper für die Immundetektion, -cytochemie und -histochemie Die Antikörper gegen HPV45 E7 wurden in Milch-Blockpuffer und einer Konzentration von 1 μ g/ml für die Immundetektion eingesetzt. Die Konzentrationen für die Immunzytochemie variierten und sind der Tabelle zu entnehmen. Der Tetraspanin 1 Antikörper wurde für die Immundetektion sowie der Immunzyto- als auch Immunhistochemie in der angegebenen Konzentration eingesetzt. | 32 |
| 7 | Verwendungsmöglichkeiten der generierte monoklonalen Antikörper gegen HPV45 E7. Die generierten monoklonalen Antikörper gegen das HPV45 Onkoprotein E7 wurden für ihre Verwendbarkeit bei der Immundetektion, Immunzyto und -histochemie sowie für den Einsatz im <i>Sandwich</i> -ELISA überprüft. Mit Ausnahme der Immunhistochemie sind die generierten Antikörper für alle Methoden geeignet und einsetzbar. Für Immunhistochemie (IHC), Immunzytochemie (IZC) und <i>Sandwich</i> -ELISA bedeuten + anwendbar und - nicht anwendbar. Für die Immundetektion (ID) geben ++ ein starkes, + ein schwaches und - kein detektierbares Signal an. Nicht durchgeführt ist mit n.d. abgekürzt. | 52 |
| 8 | Kreuzreaktivität der generierte monoklonalen Antikörper gegen das HPV E7 Protein. Um die HPV-Typ Spezifität der generierten monoklonalen Antikörper gegen E7 zu testen, wurden die entsprechenden Gene durch Transfektion in COS-7 Zellen eingebracht und diese für immunzytochemische Färbungen eingesetzt. Für die Kreuzreaktivität bedeutet + das der Antikörper das Protein bindet und - das er nicht bindet. | 52 |

- 9 **HPV Prävalenz in den gesammelten zervikalen Abstrichproben.** Durch Genotypisierung wurde der HPV Typ jeder Patientin bestimmt. Dabei wurden Doppelinfektionen für jeden HPV Typ einzeln gezählt. Alle *high risk* HPV Typen die nicht HPV16, 18, 31, 33, 45, 52 oder 58 waren wurden unter HR zusammengefasst. Die *low risk* HPV positiven Proben wurden unter LR zusammen gefasst. 57
- 10 **Histologische Einstufung zu den gesammelten zervikalen Abstrichproben.** Bei Verdacht auf eine Neoplasie, nach der kolposkopischen Begutachtung, wurde im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung eine Biopsie entnommen und anschließend histopathologisch untersucht. 58
- 11 **Zuordnung des HPV-Status zu der Histologie der gesammelten klinischen Proben.** Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der histologischen Einstufung der Patientinnen zu den entsprechenden HPV-Typen für die untersuchten Proben. Alle *high risk* HPV Typen die nicht HPV 16, 18 und 45 waren wurden unter HR zusammengefasst. 58
- 12 **Vierfeldertafel zur Bestimmung der Test-Validität im Vergleich zum HPV-DNA-Test als Referenztest** Unter den 223 getesteten Proben befanden sich sieben HPV45 positive Proben. Davon wurde eine auch als solche detektiert, weiterhin wurden zwei Proben anderen HPV Typs sowie fünf HPV-negative Proben als positiv detektiert. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 14,3% und eine Spezifität von 96,8%. 59
- 13 **Vierfeldertafel zur Bestimmung der Test-Validität im Vergleich zum histologischen Befund** Unter den 223 getesteten Proben befanden sich zwei HPV45 positive, leicht-gradige CIN, sowie fünf HPV45 positive aber histologisch unauffällige Patientinnen. Von den als normal eingestuften Proben wurde keine und von den zwei leicht-gradigen CIN wurde eine als solche erkannt. Daraus ergibt sich, hinsichtlich der Histologie, eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 100%. 59

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren sind unbehüllte, DNA-Doppelstrang Viren mit einem ikosaedrischen (20-seitiges) Kapsid, bestehend aus 72 pentamerischen Kapsomeren, welches einen Durchmesser von circa 55 nm besitzt [54]. Das Kapsid besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem 55 kDa L1 und dem 72 kDa großem L2 Protein [169, 170] und enthält ein an Histone gebundenes, doppelsträngiges DNA Molekül mit einer Länge von circa 7900 Basenpaaren bp [54].

Das HPV Genom (siehe Abbildung 1, Seite 1) beinhaltet acht Gene die als polycistronische RNA von einem DNA-Strang transkribiert werden. Vorgeschaltet ist ein nicht kodierender Bereich welcher regulatorische Sequenzen enthält die für die Replikation des Virusgenoms sowie für die Transkription nötig sind. Dieser Bereich wird *upstream regulatory region* (URR) oder *long control region* (LCR) genannt. Die Expression der frühen Gene (E, *early*) E1, E2, E4, E5, E6 und E7 wird durch den Promotor P₉₇ und der späten Gene (L, *late*) durch den Promotor P₇₄₂ gesteuert [49].

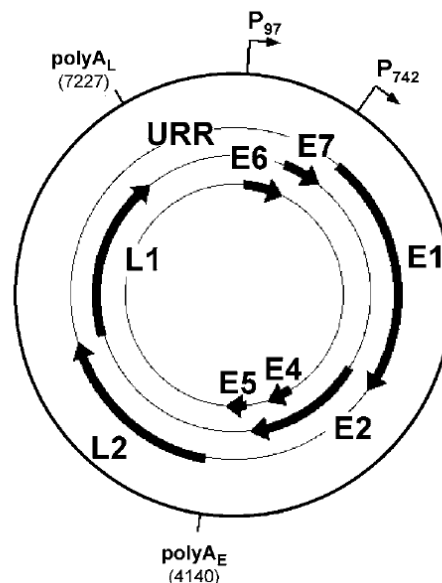


Abbildung 1: **Das HPV Genom am Beispiel des *high risk* HPV31.** Dargestellt sind die „*upstream regulatory region*“ (URR), welche regulatorische Sequenzen für die virale Replikation und Transkription enthält, die Leserahmen der frühen Gene (E, *early*) mit ihrem Promotor P₉₇ sowie der späten Gene (L, *late*), sowie der für deren Expression verantwortliche Promotor P₇₄₂ [49].

Die frühen Genprodukte E1 und E2 bilden einen Komplex und regulieren die DNA Replikation des viralen Genoms [101, 32, 31]. Dabei ist das E2 Protein nicht nur für die DNA Replikation verantwortliche sondern ist ebenfalls ein Regulator der Transkription

viraler Gene [167], es steuert zum Beispiel die Transkription des E6 Gens [36, 31, 42]. Das E4 Protein ist ein Fusionsprotein, bestehend aus E4 sowie fünf N-terminalen Aminosäuren des E1 Genproduktes (E1-E4), es akkumuliert im Zytoplasma und ist an der Umgestaltung des Zytoskelett durch Interaktion mit Zytokeratinen beteiligt. Dabei wird die strukturelle Integrität der Zelle beeinträchtigt was zu einer Freisetzung der Viruspartikel führt [43]. Das E5 Protein ist ein Membranprotein und beteiligt an der Transformation der Wirtszelle [91] in der Phase vor der Integration des HPV- in das Wirtsgenom. Bei der Integration können Teile des HPV Genoms deletiert, beziehungsweise aufgrund der häufigen Linearisierung im E1/E2-Bereich des Virusgenoms von ihrem Promotor getrennt werden, darunter das E5 Gen [146]. Die letzten zwei frühen Gene E6 und E7 kodieren für die beiden Hauptonkoproteine des HPV. Die beiden Proteine greifen in die Regulation des Zellzyklus ein um primär die Virusreplikation zu fördern. Dieses Eingreifen kann jedoch auch zur Transformation und Immortalisierung der Wirtszelle führen [119, 104]. E6 bewirkt unter anderem den Ubiquitin vermittelten Abbau von p53 [139] und E7 bindet unter anderem an das Retinoplastom Protein (pRB) und induziert ebenfalls dessen Abbau über den Ubiquitin-Proteasom Weg [45, 18]. Kodierend für die beiden Bestandteile des Viruskapsid, die Proteine L1 und L2, sind die gleichnamigen, späten Gene L1 und L2. Der virale Lebenszyklus ist an die Differenzierung der infizierten epithelialen Zellen gebunden. Durch Verletzungen des Gewebes gelangen die Viruspartikel an die Zellen der Basalschicht und infizieren diese. Während der Differenzierung der infizierten Zellen und deren Verdrängung in die oberen Gewebeschichten repliziert sich das Virus und wird letztendlich wieder von den Zellen freigesetzt (siehe Abbildung 3, Seite 4) [49]. Während in diesen leicht-gradigen Neoplasien das Virusgenom episomal vorliegt, ist es auch möglich das es sich in das Genom der Wirtszelle integriert, dadurch reduziert sich die Anzahl der Kopien und die infizierten Zellen weisen eine gesteigerte Proliferation auf [71]. Ursache dafür ist die durch die Integration bedingte Deletion, beziehungsweise Entkopplung zum Promotor, von Bereichen des HPV-Genoms, welche unter anderem für das E2 Gen kodieren. Durch Abwesenheit des E2 Proteins werden die Onkoproteine E6 und E7 expri-miert was zu einer dauerhaften Aktivierung des Zellzyklus führt. Dabei entstehen schwer-gradige zervikale Neoplasien die sich zu einem Zervixkarzinom weiterentwickeln können (siehe Abbildung 3, Seite 4) [146, 71].

1.2 Das Zervixkarzinom

Der Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) ist nach Brust- und Darmkrebs die dritt häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit. Die derzeit aktuellen Schätzungen aus dem Jahr 2008 ergaben 530000 Neuerkrankungen und 275000 Todesfälle weltweit. Hoch-Risiko Gebiete für Erkrankung sowie Sterblichkeit sind dabei Südamerika, Afrika und Süd-Zentral Asien (siehe Abbildung 2, Seite 3). In Deutschland erkranken jährlich circa 4440 Frauen am Zervixkarzinom und 2018 versterben [185].

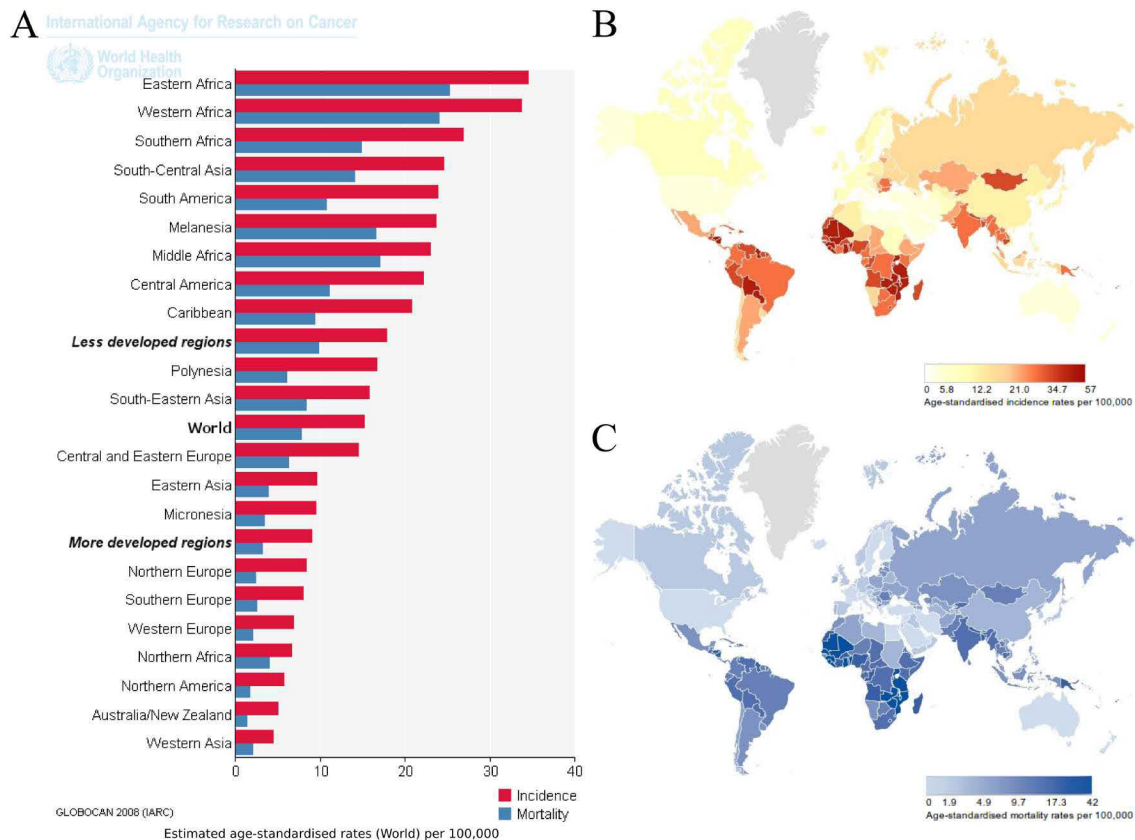


Abbildung 2: **Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms.** A) Diagramm der Raten, pro 100000 Frauen, für die Häufigkeit (rot, *Incidence*) und Sterblichkeit (blau, *Mortality*) des Zervixkarzinoms in verschiedenen Regionen der Erde. B) Weltkarte zur Übersicht der Häufigkeit des Zervixkarzinoms. C) Weltkarte zur Übersicht der Sterberate des Zervixkarzinoms. [185].

Das Zervixkarzinom entwickelt sich aus Präkanzerosen welche, basierend auf ihrer Lokalisation und Größe, als zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN, *cervical intraepithelial neoplasia*) bezeichnet werden. Dabei werden leichte Veränderungen (Dysplasien) CIN1 genannt. Diese veränderten, neoplastischen Zellen befinden sich im unteren Drittel des Epithels, der Basalschicht. Sie resultieren aus einer Infektion durch humane Papillomaviren (HPV) und einer daraus folgenden Störung der epithelialen Differenzierung. Sie werden als leicht-gradige CIN (*low-grade CIN*) bezeichnet. Moderate Dysplasien werden als CIN2 und schwere als CIN3 bezeichnet. Sie umfassen neoplastische und mitotisch aktive Zellen in den unteren zwei Dritteln, beziehungsweise der gesamten Dicke des Epithels. Sie werden als schwer-gradige CIN (*high grade CIN*) bezeichnet und zeichnen sich durch zunehmende atypische Morphologie aus und sind Vorstufen des Zervixkarzinoms. Zum Stadium CIN3 wird ebenfalls das Frühstadium des Zervixkarzinoms *Carcinoma in situ* gezählt (siehe Abbildung 3, Seite 4) [184].

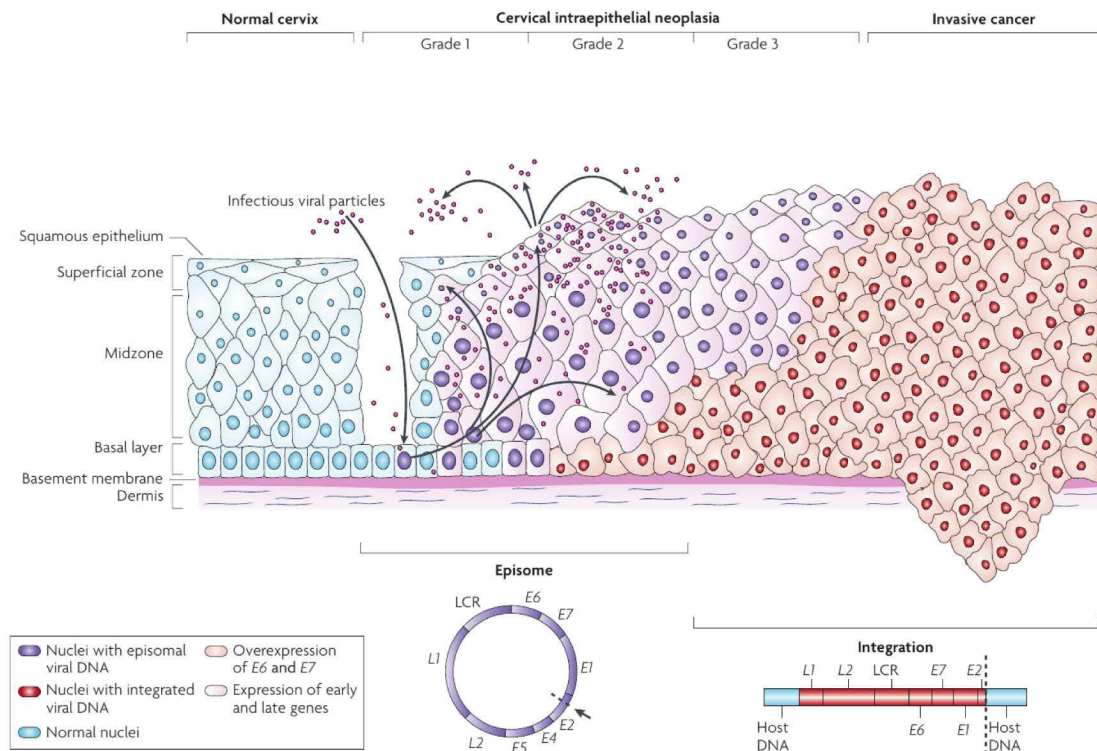


Abbildung 3: Entwicklung des Zervixkarzinoms nach Infektion durch humane Papillomaviren. Dargestellt ist der schematische Verlauf von der Infektion mit HPV bis zur Entwicklung des Zervixkarzinoms. Durch kleine Verletzungen gelangen HPV Partikel an die Zellen der Basalschicht (*Basal layer*) und infizieren diese. Nach Infektion werden die frühen Gene E1, E2 und E4-E7 exprimiert und dadurch die virale Replikation initiiert. In den darauffolgenden Gewebeschichten, der Mittel- und Superficialzone (*Midzone und Superficial zone*) beginnt die Expression der späten Gene L1 und L2 und die Bildung der Viruspartikel, welche dann abgegeben werden und erneut Zellen infizieren können. In den leicht-gradigen Neoplasien findet die Replikation der Viren statt. Aus den leicht-gradigen Neoplasien können sich schwer-gradige Neoplasien entwickeln, was mit einer Integration des Virusgenoms einhergeht, und diese wiederum können sich zu einem Karzinom weiterentwickeln (modifiziert nach [183]).

Hauptursache zervikaler Neoplasien und des Zervixkarzinoms ist die Infektion mit humanen Papillomaviren, in 99,7% aller Zervixkarzinome liegt eine HPV Infektion vor, wobei dabei die häufigsten Typen HPV16, 18, 31 und 45 sind [177]. Von den 118 beschriebenen HPV-Typen (zusammengefasst in [39]) sind circa 40 in der Lage den Anogenitaltrakt zu infizieren, wobei davon nicht alle HPV-Typen die infizierten Zellen transformieren und immortalisieren können [202]. Durch persistierende Infektion mit HPV, kommt es zu einer Integration des viralen Genoms was zu einer Überexpression der Onkoproteine E6 und E7 führen könnte. Beide virale Proteine fördern das Zellwachstum und damit die Entstehung des Zervixkarzinoms [146, 71].

1.3 HPV induzierte Zervixkarzinogenese durch die viralen Onkoproteine E6 und E7

Nach der Infektion mit humanen Papillomaviren, kann es zu einer Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle kommen. Dabei werden Bereiche des HPV-Genoms, in denen sich das Gen für das E2 Protein befindet, einem Repressor für die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 [36], von ihrem Promotor getrennt oder deletiert. Dies kann zu einer Überexpression beider Proteine führen [146, 71]. Beide Onkoproteine greifen in verschiedene Bereiche des Zellzyklus ein was zu einem permanenten Zellwachstum führt und die infizierten Epithelzellen transformiert und immortalisiert [119, 104, 57].

Eine Funktion von E6 ist die Bindung an das Tumorsuppressorprotein p53 [181]. Wesentliche Funktionen von p53 sind zum einen die Beteiligung an der DNA Reparatur, dabei bewirkt p53 einen Zellzyklus Arrest sowie einer Inhibition der DNA Synthese bei irreparablen Schäden der DNA [94, 74]. Neben der Funktion in Tumorzellen die Proliferation zu inhibieren [41], induziert p53 ebenfalls Apoptose [189] oder Seneszenz [180] und ist in der Lage *in vivo* eine Rückbildung des Tumors zu bewirken [174]. E6 bindet, über das *E6-associated protein* (E6-AP), an p53 und induziert somit den Ubiquitin-vermittelten Abbau [140, 66, 139]. E6 ist weiterhin in der Lage die Telomerase zu aktivieren welche verantwortlich für die Replikation der Telomere an den Enden der Chromosomen ist [82]. Telomere verkürzen sich mit der Zellteilung in normalen Zellen und initiieren ab einer kritischen Länge Seneszenz [3], dieser Effekt wird in Anwesenheit von E6 aufgehoben was zu einer permanenten Zellteilung beiträgt.

Das E7 Protein bewirkt den Abbau eines weiteren Tumorsuppressorproteins, es ist in der Lage das Retinoblastom-Protein (pRB) zu binden [45] und über den Ubiquitin-vermittelten Abbau zu degradieren [18]. In seiner hypophosphorylierten Form bindet pRB den Transkriptionsfaktor E2F, was aufgrund der E7 Bindung an pRB in HPV infizierten Zellen nicht mehr möglich ist [25]. Weiterhin ist E7 in der Lage die pRB-verwandten Proteinen p107 sowie p130 zu binden [44] und, im Fall von p107, die Bindung zu E2F zu lösen, was wiederum zu der Freisetzung des Transkriptionsfaktors führt und die damit verbundene Expression Proliferation fördernder Gene induziert [192]. Weiterhin inhibiert E7 die Cyclin-abhängigen Kinase (Cdk, *cycline-dependent kinase*) Inhibitoren p21 [50] und p27 [194] was zu einer Proliferation bereits differenzierter Zellen führt [72]. Darüber hinaus fördert E7 die Expression von Cyclin A und E was wiederum zu einer erhöhten Aktivität der Cdk's führt und demzufolge das Zellwachstum initiiert [193]. Ein weiterer Inhibitor für cdk's ist p16^{Ink4a}, infolge der erhöhten E2F Freisetzung durch E7 wird dieser wie andere Zellzyklus Regulatoren verstärkt exprimiert [75], ob p16^{Ink4a}, wie p21 und p27, ebenfalls durch E7 inhibiert wird, wurde derzeit noch nicht gezeigt. Obwohl E7 allein in der Lage ist Zellen zu immortalisieren [55] und dabei für die unkontrollierte Teilung negative Effekte wie die Überexpression von p53 zu umgehen [40], steigert das Zusammenwirken

beider viraler Onkoproteine die Transformation und Immortalisierung der HPV infizierten Zelle (siehe Abbildung 4, Seite 6).

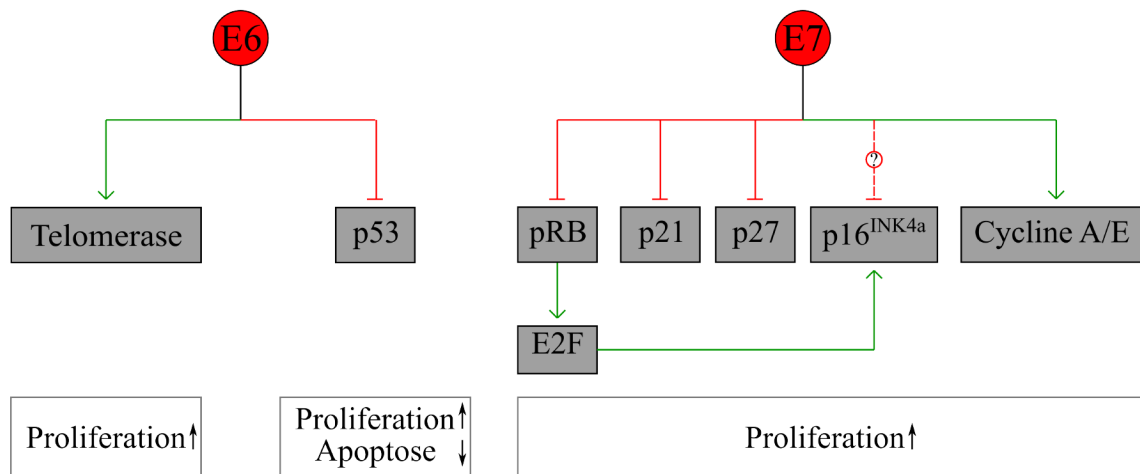


Abbildung 4: **Transformation und Immortalisierung durch die Onkoproteine E6 und E7.** Dargestellt ist eine schematische Übersicht wie die viralen Onkoproteine E6 und E7 jeweils in die Regulation des Zellzyklus eingreifen und dadurch permanentes Zellwachstum fördern. Grüne Pfeile bedeuten einen positiven und rote Linien einen negativen Effekt. E6 aktiviert zum einen die Telomerase, was eine Induzierung von Seneszenz bei fortschreitender Zellteilung inhibiert. Weiterhin bewirkt es den Ubiquitin-vermittelten Abbau von p53, dadurch verliert die Zelle einen Kontrollmechanismus der den Zellzyklus bei DNA Schäden unterbrechen, sowie Apoptose induzieren kann. E7 vermittelt unter anderem den Ubiquitin-vermittelten Abbau von pRB nach dessen Bindung, dabei wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und die Expression proliferationsfördernder Gene induziert. Weiterhin verstärkt E7 die Expression der Cycline A und E und inhibiert die Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren, p21 und p27, was zu einer verstärkten Proliferation der Zelle führt (Literaturnachweise siehe Text).

1.4 Derzeitige Zervixkarzinomvorsorge

Im Rahmen der Zervixkarzinomvorsorge werden bei allen Frauen, in regelmäßigen Intervallen zwischen einem und fünf Jahren, Zellabstriche der Ekto- und Endozervix entnommen und zytologisch untersucht. Diese Vorgehensweise zeigt jedoch bestimmte Schwächen auf. Die Qualität der entnommenen Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Begutachtung, diese werden auf morphologische Veränderungen hin untersucht, deren Interpretation sehr subjektiv ausfallen kann. Aus diesen Gründen weist die zytologische Untersuchung eine Sensitivität, für den Nachweis von CIN2 und höher gradigen Läsionen, von nur 53% auf, sowie eine Spezifität von 96,3% bei einem positiven Vorhersagewert von 20,3%. Als weitere Untersuchungsmethode dient der Nachweis von HPV-DNA (HPV-DNA-Test). Dabei beträgt die Sensitivität 96,1%, bei einer Spezifität von 90,7% jedoch nur einem positiven Vorhersagewert von 15,5%, wobei letztere in Abhängigkeit des Alters schwanken. Die schlechtere Spezifität und der schlechtere positive Vorhersagewert bei dem HPV-Test be-

ruhen auf einer hohen transienten HPV-Infektion bei jüngeren Frauen. Während der HPV-Test die Sensitivität der Primäruntersuchung erhöht und eine objektive Untersuchungsmethode darstellt, ist er jedoch nicht in der Lage einen höheren positiven Vorhersagewert zu liefern [38]. Eine weitere Verbesserung könnte der Nachweis viraler mRNA darstellen. Da die Transformation der infizierten Epithelzelle durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 verursacht wird, könnte der Nachweis der Expression beider Onkogene eine Verbesserung zum Nachweis der viralen DNA darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass mit verschiedenen Nachweissystemen die Erkennung von Patientinnen mit CIN2 oder höher, durch den Nachweis der E6/E7 mRNA, im Vergleich zum HPV-DNA Nachweis, verbessert werden konnte [122, 123, 34].

Ausgehend von dem Nachweis viraler DNA (ab der HPV-Infektion) und RNA (ab der HPV-Replikation) könnte der Nachweis der viralen Onkoproteine einen weiteren Schritt darstellen, um den positiven Vorhersagewert der Krebsvorsorge zu steigern. Es wird postuliert, dass in HPV-transformierten Zellen, im Vergleich zu HPV-infizierten Zellen, generell höhere Spiegel an viralen Onkoproteinen vorliegen. Demzufolge könnte der direkte Nachweis der Onkoproteine E6 und E7 die Zervixkarzinomvorsorge weiter verbessern (siehe Box Zervixkarzinomvorsorge in Abbildung 5, Seite 8). Weiterhin könnten auch nicht virale, zelluläre Proteine, die mit der Zervixkarzinogenese einhergehen, als molekularer Marker dienen. Als Beispiele: das durch die Wirkungsweise von E7 überexprimierte p16^{Ink4a} [79, 78] oder noch nicht näher charakterisierte Proteine wie Tetraspanin 1 [109, 182].

1.5 Die Transmembran 4 Superfamilie (TM4SF), Tetraspanine

Die Super-Familie der Tetraspanine umfasst derzeit 33 Mitglieder beim Menschen [64] und wurden erstmals in Melanom Zellen identifiziert [62]. Die zuerst identifizierten Tetraspanine CD63 (ME491, *melanoma-associated antigen*), CD37 und CD81 (TAPA-1, *target of an antiproliferative antibody-1*) zeigten eine Beteiligung an der Regulation der Zellproliferation in Tumorzellen, welche durch Antikörper gegen die Tetraspanine reduziert werden konnte [116]. Tetraspanine werden in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, wobei einige, wie CD9, CD63, CD151, weit verteilt sind [157] während andere gewebespezifisch exprimiert sind. Zum Beispiel die Uroplakine Ia und Ib (UPIa, UPIb) in der Harnblase [162] und die Retina spezifischen Tetraspanine Peripherin/RDS (*retinal degeneration slow*) und ROM1 (*retinal outer segment membrane protein 1*) [33, 10]. Tetraspanine sind Transmembranproteine und werden sowohl an der Zelloberfläche exprimiert als auch in den Membranen von Vesikeln [48], sie beteiligen sich durch Interaktionen mit anderen Proteinen an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse.

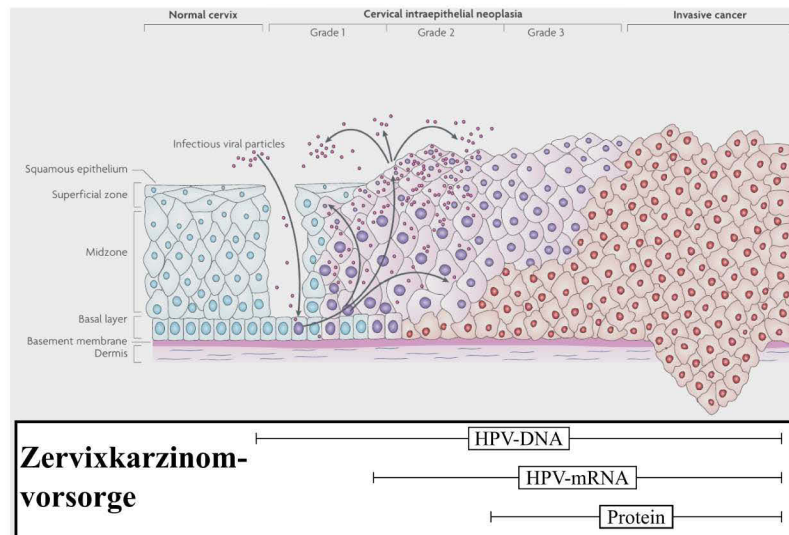


Abbildung 5: **Strategie zur Zervixkarzinomvorsorge.** Dargestellt ist der schematische Verlauf von der Infektion mit HPV bis zur Entwicklung des Zervixkarzinoms. Der Nachweis von HPV-DNA liefert eine höhere Sensitivität als die zytologische Untersuchung, allerdings eine geringere Spezifität, was zu einem geringeren positiven Vorhersagewert führt. Der Nachweis von HPV-mRNA verbessert die Erkennung schwer-gradiger Neoplasien. Der Nachweis viraler oder nicht-viraler Proteine die mit der Zervixkarzinogenese in Verbindung stehen, könnten eine weitere Stufe zur Verbesserung der Identifikation von CIN2 und höher ermöglichen (modifiziert nach [183]).

1.5.1 Struktur und Funktion von Tetraspaninen

Die Mitglieder der Tetraspanin Familie weisen eine charakteristische Struktur auf (siehe Abbildung 7, Seite 10). Sie besitzen auf der intrazellulären Seite, neben einer kleinen intrazellulären Domäne, den N- sowie den C-Terminus. Der C-Terminus kann unter anderem eine Bindungsstelle für das Adapter Protein-3 (AP-3) sein, welches an zellulären Transportprozessen beteiligt ist, Mutationsanalysen für das Tetraspanin CD63 haben gezeigt, dass CD63 anstatt in der Membran von Lysosomen an die Zelloberfläche transportiert wird wenn AP-3 nicht mehr binden kann [129]. Somit könnten Tetraspanine eine Rolle im intrazellulären Vesikeltransport spielen. Tetraspanine können intrazellulär mit weiteren Proteinen wie der Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) oder der Protein Kinase C (PKC) interagieren und diese in die räumliche Nähe von anderen Transmembranproteinen wie Integrine transportieren [14, 188, 196, 195]. Beteiligt an dieser Lokalisation, sind unter anderem Palmitoylierungen an Cysteinen nahe der intrazellulären Seite der Zellmembran. Durch diese Palmitoylierungen können Tetraspanine mit Integrinen sowie anderen Tetraspaninen interagieren (siehe Abbildung 6, Seite 9), es entstehen dadurch Mikrodomänen in der Zellmembran welche die Signalweiterleitung ins Zellinnere beeinflussen können [13, 24]. Ein weiteres typisches Merkmal der Tetraspanine sind die 4 Transmembrandomänen, wobei in den Domänen 1, 3 und 4 je eine konservierte Aminosäure enthalten ist, Asparagin in der Transmembrandomäne 1 und Glutamin oder

Glutaminsäure in den Transmembrandomänen 3 und 4 [93]. Extrazellulär werden zwei Domänen gebildet, eine kleine extrazelluläre Domäne (EC1); welche zum Beispiel beim Tetraspanin CD9 glycosyliert werden kann [17] über deren Funktion jedoch derzeit nichts bekannt ist; sowie eine große extrazelluläre Domäne (EC2). EC2 verfügt ebenfalls über Glycosylierungsstellen [186] und teilt sich in 2 Regionen auf. Eine konstante Region, bestehend aus drei α -Helices A, B und E sowie einer variablen Region, bestehend aus den α -Helices C und D (Abbildung 7 A, Seite 10). In der variablen Region der EC2 befinden sich vier konservierte Cysteine, zwei sind in einem hochkonservierten Cystein-Cystein-Glycin-Motif (CCG) integriert welche Disulfidbrücken zu den anderen beiden Cysteinen ausbilden. Je nach Tetraspanin können zwei bis vier weitere Cysteine, mit entsprechenden Disulfidbrücken, vorhanden sein durch welche sich die Klassifizierung der Tetraspanine ergibt (Abbildung 7 B, Seite 10) [93, 64]. Die konstante Region der EC2 ist an der Tetraspanin-Tetraspanin Interaktion beteiligt und der variable Teil für die Bindung von Tetraspaninen mit anderen Transmembranproteinen auf der extrazellulären Seite verantwortlich [77, 147]. Aufgrund der Interaktion von Tetraspaninen mit Signalproteinen, sowohl extra- als auch intrazellulär, beeinflussen Tetraspanine die Signaltransduktion und damit zelluläre Prozesse.

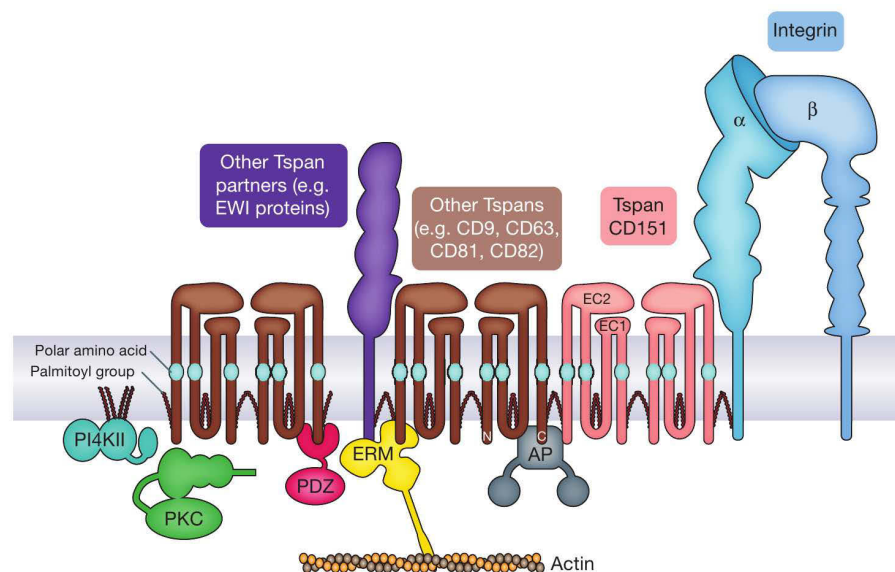


Abbildung 6: **Schematische Darstellung der Tetraspaninreichen-Mikrodomäne innerhalb der Zellmembran.** Dargestellt ist eine Membran-Mikrodomäne. Sie wird gebildet durch verschiedene Tetraspanine die, zusammen mit zum Beispiel Integrinen und Immunglobulin Superfamilie Proteinen wie EWI-2 und EWI-F, einen Proteinkomplex innerhalb der Zellmembran bilden. Intrazelluläre Bindungspartner sind verschiedene Adapterproteine (AP), Mitglieder der Aktin bindenden Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteinfamilie, der Typ II Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4KII) oder Protein Kinase C (PKC) sowie andere Proteine mit einer PDZ-Domäne für Protein-Protein Interaktionen [160].

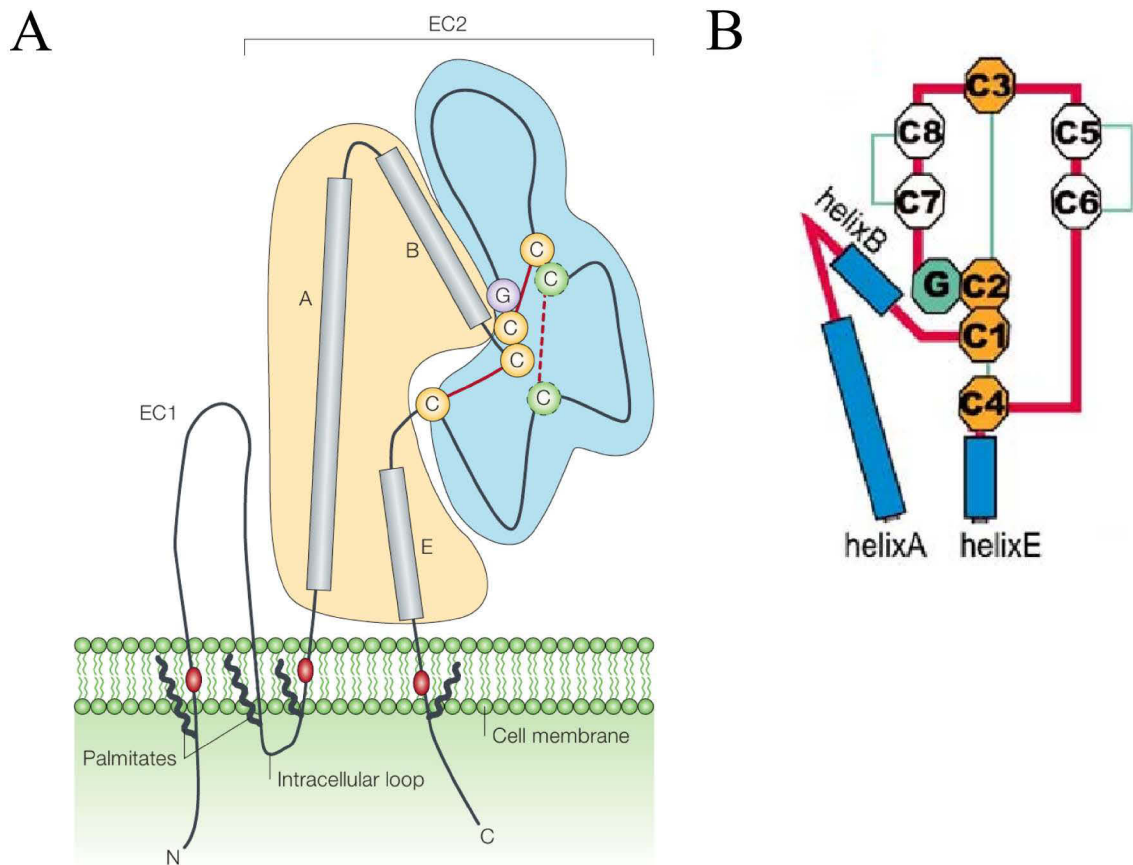


Abbildung 7: **Schematische Darstellung der Tetraspanin Struktur.** A) Dargestellt ist die Gesamtstruktur eines Tetraspanins mit den intrazellulär gelegenen N- und C-Termini sowie der kleinen intrazellulären Domäne, sowie den vier Palmitoylierungsstellen an Cysteinen nahe der Zellmembran (*Palmitates*). Weiterhin sind die vier Transmembrandomänen inklusive der, innerhalb der Tetraspanin Familie, konservierten Aminosäuren Asparagin (in Transmembrandomäne 1) und Glutamin oder Glutaminsäure (in den Transmembrandomänen 3 und 4) durch die roten Ovale dargestellt. Auf der extrazellulären Seite liegen die kleine extrazelluläre Domäne (EC1), sowie die große extrazelluläre Domäne (EC2). EC2 ist unterteilt in eine konstante Region (gelb), bestehend aus den drei α -Helices A, B und E (graue Säulen), und einer variablen Region (blau). Innerhalb der variablen Region liegen die zwei α -Helices C und D (nicht dargestellt). Hinter der α -Helix B liegt das für Tetraspanine typische, hoch konservierte, Cystein-Cystein-Glycin-Motif (CCG) welches mit zwei weiteren hoch konservierten Cysteinen (gelbe Kreise) zwei Disulfidbrücken (rote Linien) ausbildet. Neben diesen vier konservierten Cysteinen können Tetraspanine noch zwei (grüne Kreise) bis vier (nicht dargestellt) weitere Cysteine besitzen, welche ebenfalls Disulfidbrücken ausbilden können (rote gestrichelte Linie) [59]. B) Dargestellt ist ein Schema der großen extrazellulären Domäne EC2 mit den drei α -Helices A, B und E (blau Säulen) der konstanten Region, und dem CCG-Motif sowie den zwei weiteren konservierten Cysteinen (gelbe Achtecke) in der variablen Region der EC2 mit den entsprechenden Disulfidbrücken (grüne Linien). Neben diesen 4 konservierten Cysteinen können zwei bis vier weitere Cysteine vorkommen (weiße Achtecke), die ebenfalls Disulfidbrücken ausbilden (grüne Linien) [64].

1.5.2 Beteiligung von Tetraspaninen an der Signalweiterleitung

Tetraspanine binden zum einen intrazellulär, über Palmitoylierungen [13, 24], und zum anderen extrazellulär, durch die große extrazelluläre Domäne (EC2) [77, 147], an andere Tetraspanine sowie Transmembranproteine wie Integrine. Dadurch bilden sie Mikrodomänen in der Zellmembran welche Signalweiterleitungsprozesse vom äußeren der Zelle ins innere weiterleiten. Integrine bilden dabei die Hauptgruppe von Proteinen die mit Tetraspaninen interagieren [11, 15, 188]. Integrine sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Adhäsion und Zellbeweglichkeit beteiligt (siehe Kapitel 1.6.2, Seite 18). Die Adhäsion der Laminin-bindenden Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$ zu ihrem Liganden, Laminin, wird verstärkt durch die Anwesenheit des Tetraspanins CD151 [89, 110]. Die Zellbeweglichkeit endothelialer Zellen wird durch Tetraspanin-Integrin Komplexe an Zell-Zell-Kontakten, bestehend aus CD151, CD81 und Integrin $\alpha_3\beta_1$, beeinflusst. Blockiert man, durch spezifische Antikörper, eines der drei Komponenten wird die Zellmigration, im Fall von CD151 ebenfalls die Invasion, von Endothelzellen vermindert, in dem die Adhäsion zu Proteinen der extrazellulären Matrix erhöht wird [191]. Neben Interaktionen mit Integrinen, binden Tetraspanine ebenfalls Proteine der Immunglobulin Superfamilie und verbinden diese mit Integrinen. Die Tetraspanine CD9 und CD81 verbinden dadurch EWI-2 und Integrin $\alpha_3\beta_1$ was wiederum zu einer Reduktion der Zellmigration in Epithelzellen führt [161]. In lymphoiden Zellen verbindet CD81 EWI-2 mit $\alpha_4\beta_1$ was zu einer Veränderung der Morphologie und Migration der Zellen führen könnte [84]. Weiterhin konnte in Prostatakarzinom Zellen ebenfalls eine verminderte Migration durch die Interaktion von CD82 mit EWI-2 nachgewiesen werden [198]. Tetraspanine greifen somit aktiv in die zellulären Prozesse Adhäsion und Zellbeweglichkeit ein. Eine Verbindung und Beeinträchtigung von Wachstumsfaktor Rezeptoren durch Tetraspanine ist derzeit wenig erforscht. Es konnte gezeigt werden das eine Interaktion zwischen CD82 und dem Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor (HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*) besteht, welche zu einer verminderten Liganden- sowie Integrin-vermittelten Phosphorylierung führt, was einhergeht mit einer verminderten Invasivität der Prostatakarzinomzelllinie PC3 [158]. Eine indirekte Verbindung zum Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und einem Tetraspanin besteht darin, dass CD9 an den membranständigen Transformierenden Wachstumsfaktor- α (TGF- α , *transforming growth factor- α*) binden kann, was in einer verminderten proteolytischen Spaltung und somit Bildung des löslichen TGF- α führt. Daraus resultiert eine verstärkte autokrine TGF- α vermittelte Aktivierung des EGF-Rezeptors, was wiederum zu einer gesteigerten Proliferation führt [151]. Neben der Beteiligung von Tetraspaninen an Regulationsprozessen für Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit konnte, durch extrazelluläre Einflussnahme, eine Beteiligung an der Steuerung der Zellproliferation gezeigt werden [116].

Neben den Interaktionen von Tetraspaninen mit extrazellulären Signalproteinen und der

darauffolgenden Modulation der Signaltransduktion, binden Tetraspanine ebenfalls an intrazelluläre Signalproteine und nehmen damit weiter Einfluss auf die Steuerung zellulärer Prozesse. Verschiedene Tetraspanine (CD63, CD81, CD151) sind in der Lage an die Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) zu binden und sie dadurch in räumliche Nähe zu Integrinen zu transportieren [14, 188]. Es konnte gezeigt werden dass die Aktivität der, an das Tetraspanin CD81 gebundenen, PI4-Kinase, und damit die Synthese von Phosphoinositiden wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) erhöht wird, was zu einer Rekrutierung an die Zellmembran und Phosphorylierung von *Src homology 2 domain containing* (Shc) führt. Dies wiederum resultiert in einer Aktivierung der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Erk1/2 und gesteigerter Proliferation in Fibroblasten und Lebertumorzellen [21]. Die Blockierung des Tetraspanin CD9 durch einen spezifischen Antikörper bewirkt eine Reduktion der Proliferation und Initiierung von Apoptose in verschiedenen Magen-, Darm-, Bauchspeicheldrüsen- sowie Lungenkrebszelllinien. Dabei wurde nach Blockierung eine gesteigerte Phosphorylierung von Shc, c-Jun N-terminal Kinase/Stress-aktivierte Protein Kinase (JNK/SAPK), Mitogen-aktivierte Protein Kinase p38 sowie Caspase-3 beobachtet [102]. Neben der PI4-Kinase können die Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82 sowie CD151 die Protein Kinase C (PKC) binden [195]. Es wurde gezeigt dass CD151, in epidermalen Zellen, an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch die Protein Kinase C (PKC) und die GTPasen *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) und *cell division control protein 42 homolog* (cdc42) beteiligt ist, was zu einer verstärkten Zell-Zell-Adhäsion führt [152]. Die Aktin-Zytoskelett Veränderungen werden extrazellulär durch Laminin und intrazellulär über den Adapterprotein Komplex p130Cas–CRKII–DOCK180 zu den GTPasen *Ras homolog gene family* (Rho) und Rac reguliert [53], extrazellulär bindet Laminin an die Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$, was durch CD151 verstärkt wird [89, 110]. Dies könnte auf eine aktive Rolle von CD151 in der Umgestaltung des Zytoskeletts hindeuten. Im Gegensatz dazu inhibiert CD151 die Adhäsion-vermittelte Aktivierung von Ras, und damit dem MAP-Kinase Weg zu Erk1/2, sowie Protein Kinase B (PKB/Akt) [137]. Eine weitere Negativregulation der Zellmigration in Prostatakarzinom Zellen wird durch CD82 vermittelt, nach CD82 Expression wird p130CAS vermindert exprimiert was zu einer reduzierten Komplexbildung mit dem Adapterprotein CrkII führt, welches die Rac-abhängige Zellmigration steuert (Abbildung 8, Seite 13) [197, 81].

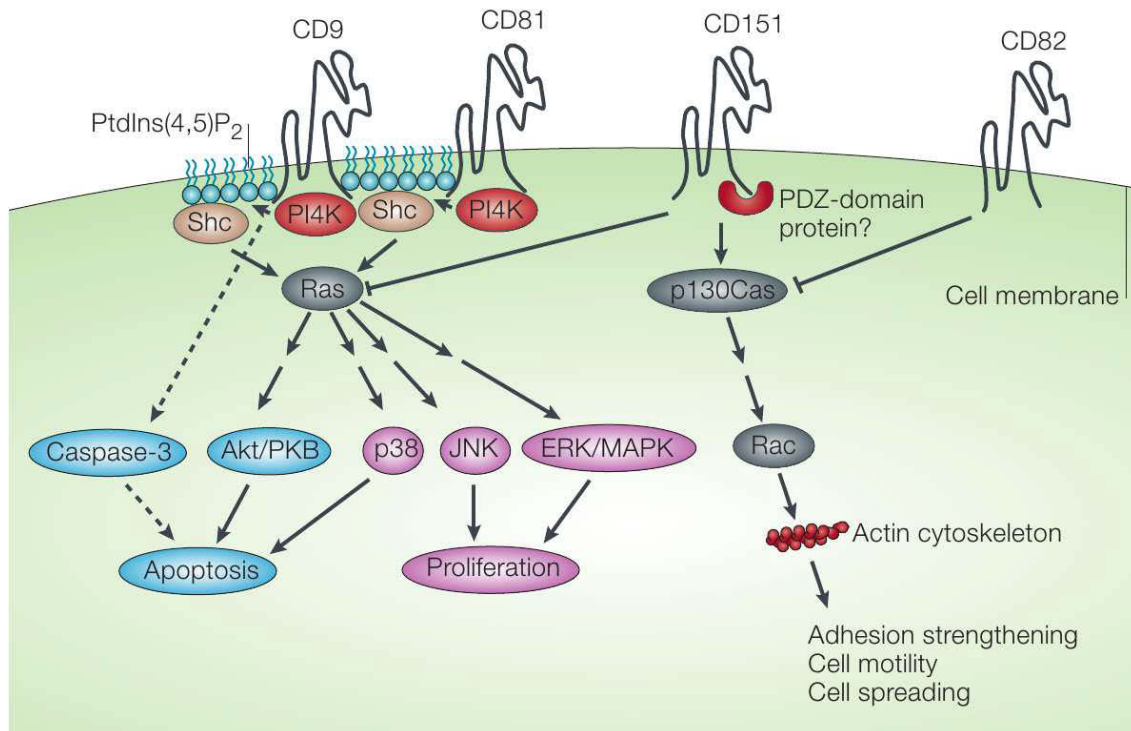


Abbildung 8: **Tetraspanine und ihre Beteiligung an der Steuerung zellulärer Prozesse [59].** Schematisch dargestellt sind die Tetraspanine CD9, CD81, CD82 und CD151 und die durch sie beeinflussten Signalwege. CD9 ist an der Signalweiterleitung über das Adapterprotein *Src homology 2 domain containing* Shc zu dem Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Weg, speziell p38, sowie JNK und Caspase 3 beteiligt, was zu veränderter Proliferation und Apoptose der Zelle führt [102]. CD81 bindet und erhöht die Aktivität der Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) und damit die Synthese von Phosphoinositiden (PtdIns), diese rekrutieren Shc an die Zellmembran was in einer weiteren Aktivierung der MAPK Erk1/2 und gesteigerten Proliferation resultiert [21]. CD151 vermindert die Aktivierung von Ras und somit ebenfalls dem MAPK Weg zu Erk1/2 sowie Akt/PKB [137] und könnte dadurch ebenfalls die Zellproliferation und Apoptose modulieren. CD82 beeinflusst, durch Remodulierung des Zytoskeletts, über das Adapterprotein p130 *Crk-associated substrate* (p130CAS) und Rac, die Zellbeweglichkeit [197].

Tetraspanine dienen als Strukturkomponenten in Mikrodomänen der Zellmembran, in welchen sich unter anderem Integrine und Wachstumsfaktor Rezeptoren zusammen lagern. Dabei nehmen Tetraspanine zusätzlich Einfluss auf die Ligandenbindung zu den verschiedenen Rezeptoren und sind darüber hinaus intrazellulär an der Rekrutierung weitere Signalproteine an die Zellmembran beteiligt. Durch diese Einflussnahme von Tetraspaninen auf verschiedene Signalmoleküle sind sie an der Steuerung zelluläre Prozesse wie Migration, Invasion, Proliferation und Apoptose beteiligt, und spielen somit eine wichtige Rolle, als Tumorsuppressor oder Zielprotein für therapeutische sowie diagnostische Ansätze, in verschiedenen Tumorarten.

1.5.3 Die Rolle der Tetraspanine bei Krebserkrankungen

Tetraspanine wurden erstmals entdeckt aufgrund ihrer Eigenschaft die Proliferation von Tumorzellen zu verändern. Antikörper gegen die Tetraspanine CD63/ME491 (*melanoma-associated antigen*) und CD81/TAPA-1 (*target of an antiproliferative antibody-1*) reduzierten die Zellproliferation in Tumorzellen [62, 116] was im weiteren zur Identifizierung der ersten Tetraspanine führte. In weiteren Untersuchungen zeigten sich zusätzliche Beteiligungen von Mitgliedern der Transmembran 4 Superfamilie an wichtigen Zellfunktionen wie Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion und der Zellbeweglichkeit (siehe Kapitel 1.5.2, Seite 11). Aufgrund ihrer Assoziation an diesen für die Tumorentstehung und Metastasierung wichtigen Abläufe, können Tetraspanine Ansatzpunkt für die Tumorthherapie, durch den Einsatz spezifischer Antikörper zur Blockierung ihrer Funktion, sein, sowie als Markerproteine für die Diagnose zur Früherkennung und Nachsorge dienen, wie die folgenden Beispiele belegen.

Das Tetraspanin CD9 (MRP-1, *motility-related protein-1*) ist an der Regulation der Zellbeweglichkeit beteiligt, bei Anwesenheit von CD9 zeigten Tumorzellen eine verminderte Beweglichkeit [99]. Untersuchungen beim Mammakarzinom ergaben bei verminderter CD9 Expression im Primärtumor ebenfalls eine reduzierte Zahl an Lymphknotenmetastasen [99]. Dies korrelierte ebenfalls mit der Überlebensrate, bei vorhandener Expression von CD9 war die Überlebensrate der Patientinnen höher im Vergleich zu denen mit einer verminderten Expression [100]. Ähnliche Ergebnisse wurden für CD9 bei Lungenkrebs sowie beim Pankreaskarzinom festgestellt, auch hier war die Überlebensrate höher bei Patienten mit CD9 positiven Tumoren im Vergleich zu Patienten deren Tumore CD9 negativ waren [60, 154]. Im Fall des Pankreaskarzinom korreliert ebenfalls die CD82 Expression mit der Überlebensrate der Patienten, diese war höher in Patienten deren Tumor CD82 exprimiert im Vergleich zu Patienten welche keine CD82 Expression im Tumorgewebe aufzeigten [154]. Ein weiteres Tetraspanin, als aussagekräftiger Tumormarker, ist CD151. Die Expression von CD151 korreliert, im Gegensatz zu den anderen genannten Beispielen, mit einer verminderten Überlebensrate, unter anderem von Patienten mit Lungenkarzinom [168], Prostatakarzinom [6], Brustkrebs [133] sowie Endometriumkarzinom [175].

Über die Funktion der meisten im Menschen vorkommenden Tetraspanine ist derzeit nicht viel bekannt (siehe [64]). Wie bereits beschrieben sind einige Tetraspanine wie CD9, CD81, CD82 und CD151 aufgrund ihrer Beteiligung an Steuerungsprozessen wichtiger Zellfunktionen nicht nur bei der Tumorprogression sondern auch -suppression involviert, was sie bedeutsam für die Tumorforschung macht. Die Analyse der Funktionen weiterer Tetraspanine könnte zusätzliche Ansatzpunkte für Therapie und/oder Diagnostische Methoden bei Tumorerkrankungen liefern um die bisherigen Verfahren zu verbessern oder zu erweitern.

1.5.4 Tetraspanin 1 (Tspan1, NET-1)

Durch die Suche nach Markerproteinen, die im Zusammenhang mit der HPV-induzierten Entstehung des Zervixkarzinoms stehen, wurde das Gen für Tetraspanin 1 in HPV immortalisierten Keratinozyten als überexprimiert, in den tumorähnlichen späten Passagen im Vergleich zu den nicht-tumorähnlichen frühen Passagen der Zelllinie, identifiziert. Durch RNA-RNA-*in situ* Hybridisierung wurde die Überexpression ebenfalls in schwer-gradigen, präkanzerösen Vorstufen sowie in mehr als der Hälfte der untersuchten Zervixkarzinome gezeigt [109]. Weiterhin wurde die Proteinexpression an Gewebematerial von zervikalen Normalgewebe, Dysplasien sowie Zervixkarzinomen untersucht. Dabei konnte eine Tetraspanin 1 Expression in mehr als 50% der unreifen Metaplasien in Zellen der Basal- sowie in wenigen Fällen der Parabasalschicht festgestellt werden. Eine Expression von Tetraspanin 1 im gesamten Epithelgewebe konnte nur in schwer-gradigen CIN 2 und CIN3 sowie in schwach und mittel differenzierten Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen festgestellt werden, nicht jedoch in Normalgewebe, reifen Metaplasien und leicht-gradigen CIN1 sowie ausdifferenzierten Karzinomen. Aufgrund der Tatsache das nur in einem Teil der schwer-gradigen Dysplasien Tetraspanin 1 über die gesamte Gewebeschicht exprimiert wird, liegt die Vermutung Nahe das Tetraspanin 1 besondere Aufgaben erfüllt die möglicherweise in Zusammenhang mit der fortschreitenden Entwicklung zum Zervixkarzinom stehen [182]. Tetraspanin 1 wurde weiterhin im Magenkarzinom nachgewiesen, es wurde in circa der Hälfte der untersuchten Karzinome exprimiert was mit einer schlechten Überlebensrate der Patienten korrelierte. Weiterhin zeigten die Patienten mit Tetraspanin 1 Expression im Tumorgewebe ebenso eine Metastasierung von Tumorzellen in die angrenzenden Lymphknoten [27]. Weiterhin konnte Tetraspanin 1 im Leberzell- [28] sowie Ovarialkarzinom nachgewiesen werden [144]. In den untersuchten Ovarialkarzinom Geweben wurde Tetraspanin 1 hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln gefunden und in nur wenigen Fällen in der Zellmembran was darauf hindeutet das es in diesen Zellen an Sekretionsprozessen beteiligt sein kann [144]. Tetraspanin 1 besitzt vier mögliche N-Glycosylierungsstellen in seiner große extrazelluläre Domäne (EC2). Deren Glycosylierung scheint für eine korrekte Faltung des Proteins essenziell zu sein [145]. Tetraspanin 1 bindet in den Darmepithelzelllinien (Caco-2 und HuTu-80) an den humanen Thiamin Transporter-1 (hTHTR-1) und vermindert dadurch dessen Abbau was zu einer erhöhten Aufnahme von Thiamin (Vitamin B₁) führt [105]. In humanen Plattenepithelkarzinomzellen der Hals- und Kopfregeion, 029 HNSCC (*human head and neck squamous cell carcinoma*), wurde gezeigt das Tetraspanin 1 ebenso in der Lage ist Midkin (*heparin-binding growth factor*) zu binden und darüber ebenfalls an die Integrin Untereinheiten α_6 und β_1 . Die Tetraspanin 1-Integrin β_1 Komplexe sind dabei in der Zellmembran an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Darüber hinaus bindet unter Midkin Einfluss die phosphorylierte *focal adhesion kinase* (FAK) an Tetraspanin 1 was in einer Signalweiterleitung und Phosphorylierung zu Paxillin und *signal transducers and acti-*

vators of transcription 1 (STAT1) sowie der Interaktion von FAK und STAT1 resultiert. Wurde die Genexpression einer dieser Komponenten unterdrückt, zeigten die Zellen eine drastisch verminderte Zellmigration und -invasion [65].

Tetraspanin 1 kommt als potentiell Markerprotein für verschiedene Tumorarten in Frage und könnte aufgrund seiner Beteiligung an Signalwegen die zu Zellmigration- und invasion führen ebenfalls ein potentiell Zielprotein für Therapieansätze sein.

1.6 Regulation der Zellbeweglichkeit und -proliferation durch Signaltransduktion

Die Steuerung wichtiger zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose, Migration oder Invasion wird durch eine Kette aus verschiedenen Signalproteinen reguliert, der Signaltransduktion. Über extrazelluläre Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte, wird über Transmembranrezeptoren das Signal ins Zellinnere übertragen und über spezifische Signalwege zu ihrem Bestimmungsort geleitet. Diese Mechanismen sind komplex und derzeit nicht vollständig aufgeklärt.

Für die Tumorentstehung ist die Immortalisierung, also unbegrenztes Zellwachstum (Proliferation) und -teilung sowie das Zellüberleben, ein wesentlicher Prozess. Hinzu kommt die Herauslösung der Tumorzellen aus dem ursprünglichen Gewebeverband und Invasion in andere Gewebeschichten oder das Blut- und Lymphsystem, was zur Metastasierung führt. Für diese Eigenschaften ist die Regulation der Zellbeweglichkeit von Bedeutung.

In diesem Kapitel sollen diese, für die Tumorentstehung und -progression relevanten, Steuermechanismen beschrieben werden.

1.6.1 Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion über den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

Die Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) Familie umfasst 4 Mitglieder, den EGFR [172], *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/ErbB2/neu) [35], *human epidermal growth factor receptor 3* (Her3/ErbB3) [86] und den *human epidermal growth factor receptor 4* (Her4/ErbB4) [120]. Sie sind Typ I Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK), bestehend aus einer hoch konservierten intrazellulären Kinasedomäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und auf der extrazellulären Seite eine Ligandenbindungsdomäne [172]. Nach Bindung des für den jeweiligen Rezeptor spezifischen, Liganden dimerisiert der Rezeptor, dabei können Homo- und Heterodimere entstehen [127, 178] was zu einer Autosphosphorylierung verschiedener intrazellulärer Serin- und Tyrosinreste führt, die als Bindungsstelle für verschiedene Signalproteine dienen, die wiederum verschiedene Signalkaskaden aktivieren (siehe Abbildung 9, Seite 17). Die Deaktivierung des Rezeptors erfolgt durch Endozytose, gefolgt von einem Ubiquitin-vermitteltem Abbau oder einer Regenerierung durch Dissoziation des Liganden und Rücktransport an die Zelloberfläche

(siehe Übersichtsartikel [121]).

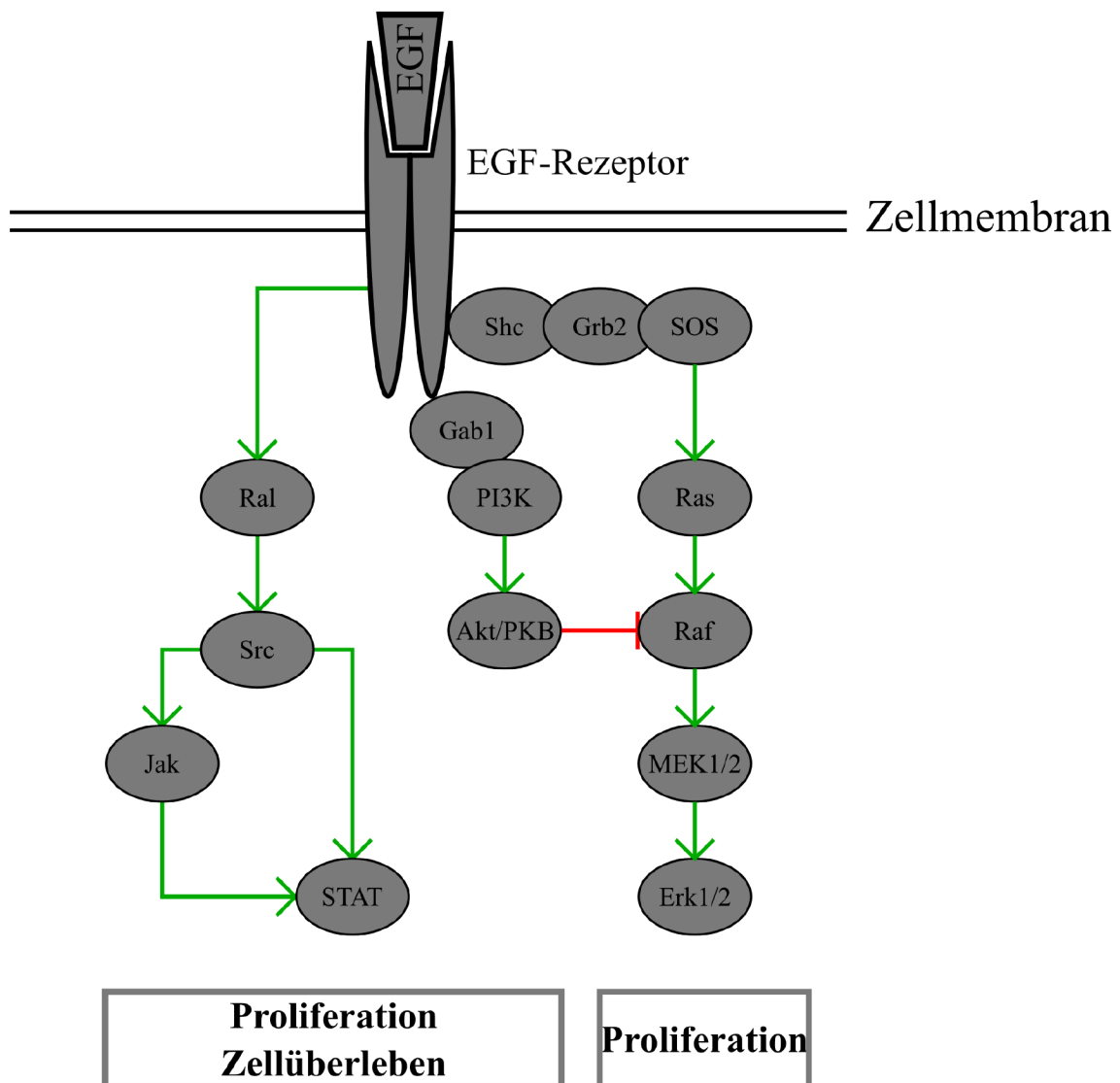


Abbildung 9: **Wachstumsfaktor-induzierte Signalweiterleitung über den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR).** Über den, durch EGF, aktivierten Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Dargestellt sind die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg über Ras, welcher die Zellproliferation reguliert, sowie der für das Zellüberleben wichtige Signalweg der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K). Weiterhin kann über den EGFR die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Familie erfolgen (Literaturnachweise siehe Text).

Durch Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) wird zum einen der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg aktiviert. Zunächst werden die Adapterproteine *Src homology 2 domain containing transforming protein 1* (Shc) und *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) an den phosphorylierten EGF-Rezeptor rekrutiert, welche dann den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *Son of Sevenless homo-*

logs (SOS) binden, der dann die GTPase Ras aktiviert. Über die Kinase *rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma* (Raf) werden die MAP-Kinasen MEK1/2 und Erk1/2 aktiviert was verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert und zu Zellproliferation führt [124, 73, 47].

Die Familie der membrangebundenen Kinasen Src (Akronym für *sarcoma*) können ebenfalls mit dem EGF-Rezeptor assoziieren. Der autophosphorylierte Rezeptor bindet Src und diese phosphoryliert weitere Tyrosinreste des Rezeptors und moduliert somit seine Funktionen [16]. Über die Src Kinase werden unter EGF Stimulation weitere, zum Beispiel Zellwachstum und -überleben regulierende, Transkriptionsfaktoren der *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Familie phosphoryliert und damit aktiviert, dabei erfolgt die Phosphorylierung zum einen über die Janus Kinase (JAK) sowie direkt durch Src [114]. Src wird über verschiedene Mechanismen durch den EGF-Rezeptor phosphoryliert, für die Aktivierung von STAT3 im Speziellen, wird nach EGF Stimulation die Src Phosphorylierung über eine weitere GTPase, *Ras-related protein* (Ral), reguliert [52].

Ein weiteres Signalprotein dessen Aktivität durch EGF stimuliert wird ist die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K). Nach EGFR Phosphorylierung bindet das Adapterprotein *Grb associated protein 1* (Gab1) an den Rezeptor und rekrutiert die PI3-Kinase [128]. Stromabwärts der PI3-Kinase wird unter anderem die Protein Kinase B (PKB/Akt) aktiviert welche, neben einer Vielzahl weiterer Funktionen, eine negative Regulation des MAP-Kinase Signalweges hat indem es die Aktivität von Raf, durch Phosphorylierung, inhibiert und dadurch Einfluss auf die Proliferation nimmt [201]. Über die PI3-Kinase erfolgt, ebenfalls nach EGF Stimulation, die Aktivierung von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren für die GTPase *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac), welche an der Zytoskelettmodulation beteiligt ist, was unter anderem für die Zellbeweglichkeit eine Rolle spielt [165].

Ein weiterer Modulator von Migration und Invasion ist die *focal adhesion kinase* (FAK). Durch Stimulation mit EGF lokalisiert die FAK zum einen am phosphorylierten EGF-Rezeptor und zum zweiten an Integrin-Komplexe, somit wird ebenfalls die Zellmigration stimuliert [155].

1.6.2 Integrin-vermittelte Signaltransduktion, Integrin „outside-in signaling“

Die Superfamilie der Integrine sind Transmembranproteine die sich zu Heterodimeren aus 18 α und 8 β Untereinheiten, zu mindestens 24 verschiedenen Kombinationen, zusammen lagern können. Sie sind Rezeptoren für Proteine der Extrazellulären Matrix und aktivieren, unter anderem, verschiedene intrazelluläre Signalwege (siehe Übersichtsartikel [2]). In diesem Kapitel sollen die Zusammenhänge der Integrin „outside-in“ Signaltransduktion im Hinblick auf Zellproliferation und -überleben sowie der Zellbeweglichkeit be-

geschrieben werden (siehe Abbildung 10, Seite 19). Dabei nimmt die *focal adhesion kinase* (FAK) eine zentrale Rolle ein (siehe Übersichtsartikel [143]).

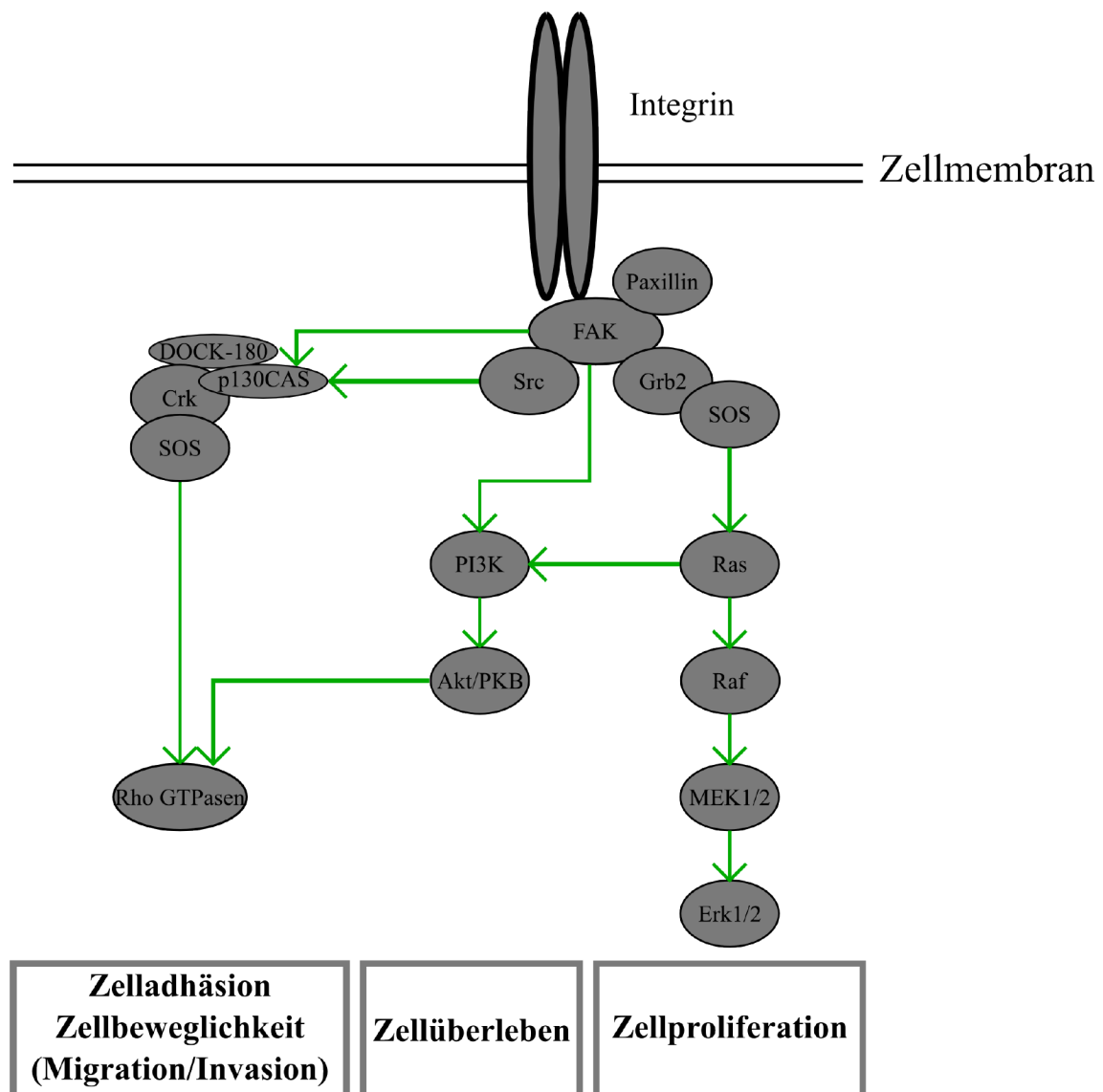


Abbildung 10: **Regulation von Zellproliferation und -überleben sowie Zellbeweglichkeit durch die Integrin „outside-in“ Signalweiterleitung.** Durch Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix wird die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung zu verschiedenen intrazellulären Signalwegen initiiert. Dargestellt sind die Regulation des Zytoskeletts durch GTPasen der *Ras homolog gene family* (Rho) Familie über die *focal adhesion kinase* (FAK) sowie der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), welche ebenfalls über die Protein Kinase B (Akt/PKB) das Zellüberleben reguliert. Weiterhin wird über Integrine die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweges gesteuert, welcher die Zellproliferation reguliert (Literaturnachweise siehe Text).

Durch die *focal adhesion kinase* wird unter anderem die Zellbeweglichkeit direkt durch Integrine gesteuert [156], aber auch durch die Interaktion von Integrinen und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor

(EGFR) [155]. Nach Bindung von Komponenten der extrazellulären Matrix, zum Beispiel Fibronectin und Laminin, an Integrine, bindet die *focal adhesion kinase* an die Integrine und autophosphoryliert sich am Tyrosin 397, woran anschließend die Kinase Src (Akronym für *sarcoma*) bindet [22] die wiederum die Tyrosinreste 576/577 phosphoryliert die für die weitere Kinaseaktivität der *focal adhesion kinase* nötig sind [20]. Hiernach rekrutiert Src ein weiteres Signalprotein, das Adapterprotein p130Crk-associated substrate (p130Cas), und sowohl die *focal adhesion kinase* als auch Src phosphorylieren p130Cas [176, 142]. An das phosphorylierte p130Cas binden weitere Komponenten und bilden einen Adapterprotein-Komplex aus *Dedicator of cytokinesis*180 (DOCK180) und *v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)* (Crk), welches als Adapter für den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *Son of Sevenless homologs* (SOS) dient. Über diesen Komplex werden die Mitglieder der *Ras homolog gene family* (Rho) GTPase Familie aktiviert, welche sowohl Zelladhäsion also auch -beweglichkeit, durch Modulation des Aktin-Zytoskelett, regulieren [176, 23, 53]. Neben GTPasen der Rho Familie, werden auch GTPasen der *Rat sarcoma* (Ras) Familie, und damit des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAP-Kinase) Signalweg, aktiviert. Dies erfolgt durch die Kinasen FAK und Src. Hierbei phosphoryliert Src, nach Bindung an die *focal adhesion kinase*, dessen Tyrosin 925, welches das Adapterprotein *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) bindet [142]. Ähnlich wie bei Wachstumsfaktor-Rezeptoren (siehe Kapitel 1.6.1, Seite 16), bindet Grb2 den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor *Son of Sevenless homologs* (SOS), welcher wiederum GTPasen der Rho- und Ras-Familie aktiviert [124]. Durch Stimulation mit Fibronectin wird über Integrin die Aktivierung von Ras und, stromabwärts des MAP-Kinase Signalweges, der MAP-Kinase Erk1/2 vermittelt [68]. Über den MAP-Kinase Signalweg werden zum einen Prozesse für die Zellbeweglichkeit reguliert [80], als auch für die Zellproliferation. Wird entweder die Aktivität von Ras oder Erk1/2 inhibiert, resultiert dies in einer Verminderung der DNA-Synthese sowie der Zellproliferation [68].

Neben der Integrin-vermittelten Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges, wird ein weitere zentrales Signalprotein, die Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), aktiviert, welches ebenfalls an der Regulation von Zellüberleben und -beweglichkeit beteiligt ist. Die PI3-Kinase wird, neben Wachstumsfaktor-Rezeptoren (siehe Kapitel 1.6.1, Seite 16), auch durch Integrin-vermittelte Signale aktiviert. Dabei ist die PI3-Kinase an der Regulation der Zellinvasion beteiligt, während die Signalweiterleitung zur Protein Kinase B (Akt/PKB) für diesen Mechanismus keine Rolle spielt, ist die Aktivierung der Rho-Familie GTPase *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) durch die PI3-Kinase für die Invasivität von Bedeutung [150]. Die PI3-Kinase ist weiterhin an der Regulation der Apoptose beteiligt. Epitheliale Zellen, die keinen Kontakt mehr zur extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) haben, induzieren Apoptose, da sie aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst wurden. Dieser Mechanismus wird durch Ras und die PI3-Kinase reguliert, dabei aktiviert Ras, nach Adhäsion der Zelle an ECM-Proteine über die Integrine, die PI3-Kinase welche anschließend durch Aktivierung der Protein Kinase B (Akt/PKB) den

Apoptosemechanismus abschaltet [76, 68]. Neben der Aktivierung der PI3-Kinase durch Ras, kann diese aber auch direkt durch Bindung an die *focal adhesion kinase* binden und aktiviert werden [26].

Ein weiteres Protein das mit der *focal adhesion kinase* interagiert, und an der Steuerung der Zellbeweglichkeit beteiligt ist, ist Paxillin [61, 126]. Paxillin ist dabei ein Adapterprotein was andere Signalproteine durch Bindung in räumliche Nähe zueinander bringt und damit deren Signaltransduktion ermöglicht (siehe Übersichtsartikel [138]).

Über Integrine werden aufgrund extrazellulärer Signale Zellproliferation und -überleben sowie Zellbeweglichkeit gesteuert. Diese Zellfunktionen sind für die Tumorentstehung und Metastasierung von Bedeutung, da sie sowohl das Fortbestehen der Tumorzellen als auch ihr Auswandern aus dem Ursprungsgewebe in andere Gewebeschichten und das Blut- und Lymphsystem sicherstellen.

1.6.3 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Die Verteilung von Tumorzellen beschränkt sich meist nicht auf den Ort ihrer Entstehung und Vermehrung, sondern weitet sich zunächst in tiefere Gewebeschichten aus, und von dort in Blut- und Lymphgefäße. Die darin abgewanderten Tumorzellen lagern sich an anderer Stelle im Körper ab und bilden dort Metastasen.

Für die Invasion und Metastasierung ist zum einen die bereits beschriebene Zellbeweglichkeit von Bedeutung (siehe Kapitel 1.6.1, Seite 16 und 1.6.2, Seite 18), und zum anderen eine Gruppe von Enzymen, die für die Invasion nötige Degradation der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, die Matrix Metalloproteinasen (MMPs).

Die Familie der MMPs umfasst, beim Menschen, 24 Gene, wobei das Gen für MMP23 doppelt vorhanden ist, und damit 23 Matrix Metalloproteinasen. Davon werden 16 MMPs von der Zelle sezerniert und sieben sind membranständig. MMPs werden als inaktive Proteine exprimiert und an der Zelloberfläche oder im interzellulären Raum durch proteolytische Spaltung, durch andere MMPs oder Serin Proteasen, aktiviert und unter anderem durch *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) inhibiert. Sie sind neben dem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix ebenfalls an der Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder Spaltung anderer Transmembranproteine beteiligt und dadurch in eine Vielzahl zellulärer Mechanismen involviert (siehe Übersichtsartikel [106, 153]).

Durch ihre Funktion die extrazelluläre Matrix abzubauen, ermöglichen die MMPs somit Tumorzellen durch die Gewebeschicht zu invadieren und zu metastasieren (siehe Übersichtsartikel [159]).

2 Zielstellung

Derzeitig werden bei der Zervixkarzinomvorsorge Zellabstriche vom Muttermund entnommen und zytologisch untersucht. Dieser Test ist subjektiv und weist eine hohe Fehlerrate auf. Durch den Nachweis anderer molekularer Marker, wie viraler mRNA und Proteine, sowie nicht viraler Proteine, könnte die Spezifität der Krebsvorsorge und Früherkennung verbessert werden.

Ziele dieser Arbeit sind, aus diesem Grund, die Entwicklung neuer Nachweissysteme für die Krebsvorsorge auf der Basis von molekularen Markern, sowie die nähere Charakterisierung eines potentiellen Marker.

Ein erstes Ziel ist die Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis des Onkoproteins E7 des humanen Papillomavirus Typ 45. Es ist hauptverantwortlich für die Transformation der infizierten Zellen. Zu diesem Zweck sollen monoklonale Antikörper generiert werden und diese zur Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA für die diagnostische Anwendung eingesetzt werden. Der entwickelte Test soll anschließend an klinischem Probenmaterial getestet und validiert werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist ein weiteres potentiell Markerprotein beim Zervixkarzinom näher zu charakterisieren, das Transmembranprotein Tetraspanin 1. Früherer Untersuchungen ergaben das Tetraspanin 1 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in schwer-gradigen Neoplasien verstärkt exprimiert wird, und möglicherweise im Zusammenhang mit der Proliferation der neoplastischen Zellen steht. Um näher zu untersuchen in welchem Zusammenhang Tetraspanin 1 zur Zervixkarzinogenese steht, sollen funktionelle Untersuchungen sowie Analysen relevanter Signaltransduktionswege durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen Hinweise auf die Funktion von Tetraspanin 1 liefern sowie seine Bedeutung als potentiellen molekularen Marker festigen.

3 Material

3.1 Puffer und Lösungen

3.1.1 Arbeiten in der Zellkultur

Medien

| | | |
|-----------------|----------------------------------|-------------|
| Einfriermedium: | DMSO | 10% |
| | FKS | 30% |
| | DMEM bzw. RPMI | 60% |
| Kulturmedien: | DMEM + 10% FKS | |
| | RPMI + 10% FKS | |
| Trypsin/EDTA: | PBS | 1x |
| | Trypsin | 0,05% (m/v) |
| | EDTA | 2 mM |
| PBS: | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,47 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 4,3 mM |
| | ddH ₂ O | |

Zelllinien

Tabelle 1: **Verwendete Zelllinien.**

| Zelllinie | Medium | HPV-Typ | Spezies | Zelltyp |
|-----------|--------|---------|-----------------|-------------------|
| CaSki | DMEM | 16 | Mensch | Zervix Karzinom |
| SiHa | DMEM | 16 | Mensch | Zervix Karzinom |
| HeLa | DMEM | 18 | Mensch | Zervix Karzinom |
| MS751 | DMEM | 45 | Mensch | Zervix Karzinom |
| C33A | DMEM | - | Mensch | Zervix Karzinom |
| COS-7 | DMEM | - | Grüne Meerkatze | Nieren-Fibroblast |

Gentransfer

| | |
|-----------------------|--|
| Serum-freie Medien: | DMEM RPMI |
| Transfektionsreagenz: | TurboFect TM <i>in vitro</i> Transfection Reagent |

Tabelle 2: **Verwendete Plasmide für die Transfektion und adenoviralen Gentransfer.**

| Gentransfer durch Transfektion | | | |
|--------------------------------|------------|---------------|--|
| Plasmid | Anbieter | Gen | |
| pCR3.1 | Invitrogen | HPV16 E7 | |
| pCR3.1 | Invitrogen | HPV18 E7 | |
| pBK-CMV | Stratagene | HPV31 E7 | |
| pBK-CMV | Stratagene | HPV33 E7 | |
| pCR3.1 | Invitrogen | HPV45 E7 | |
| pBK-CMV | Stratagene | HPV52 E7 | |
| pBK-CMV | Stratagene | HPV58 E7 | |
| pBK-CMV | Stratagene | Tetraspanin 1 | |

| Gentransfer durch Adenoviren | | | |
|-------------------------------------|------------|---------------|--|
| Plasmid | Anbieter | Gen | |
| pAd/CMV/V5 DEST Gateway (ViraPower) | Invitrogen | Tetraspanin 1 | |
| pAd/CMV/V5 DEST Gateway (ViraPower) | Invitrogen | eGFP | |

3.1.2 Invasions Assay

| | | | |
|------------------------|---|--|----------|
| Zellkultur Einsätze: | <i>Cell Culture Inserts for 24-well plates, 8.0 µm transparent PET membrane</i> | | |
| Matrigel: | <i>Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free, 10 ml *LDEV Free</i> | | |
| 70% Ethanol: | Ethanol, absolut | | 70% |
| | ddH ₂ O | | 30% |
| Kristallviolettlösung: | Kristallviolett | | 1% (m/v) |
| | ddH ₂ O | | 99% |
| 10% Essigsäure: | Essigsäure | | 10% |
| | ddH ₂ O | | 90% |

3.1.3 Proliferations und Kolonie Formations Assay

| | | |
|-----------------------|---|--------|
| Proliferations Assay: | <i>CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i> | |
| Agarose: | <i>SeaPlaque Agarose</i> | |
| 2xDMEM: | DMEM, Pulver | 20 g/l |
| | NaHCO ₃ | 88 mM |
| | FKS | 20% |
| | GlutaMAX™, 100x | 2x |
| | ddH ₂ O | |

3.1.4 Adhäsions Assay

| | | |
|------------------------|----------------------------------|-----------|
| Proteine: | Fibronektin | 10 µg/ml |
| | Laminin | 10 µg/ml |
| | Kollagen Typ I | 10 µg/ml |
| | Kollagen Typ III | 10 µg/ml |
| | Poly-L-Lysin | 150 µg/ml |
| | gelöst in PBS | |
| 2% BSA | BSA | 2% (m/v) |
| | PBS | 1x |
| PBS: | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,47 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 4,3 mM |
| | ddH ₂ O | |
| Kristallviolettlösung: | Kristallviolett | 1% (m/v) |
| | ddH ₂ O | 99% |

3.1.5 Stimulationsversuche

| | | |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Proteine: | EGF | 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | Fibronectin | 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | Laminin | 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | Kollagen Typ I | 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | Kollagen Typ III | 10 $\mu\text{g/ml}$ |
| | Poly-L-Lysin | 150 $\mu\text{g/ml}$ |
| | gelöst in PBS | |
| 2% BSA | BSA | 2% (m/v) |
| | PBS | 1x |
| PBS: | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH_2PO_4 | 1,47 mM |
| | Na_2HPO_4 | 4,3 mM |
| | ddH ₂ O | |
| Trypsin Inhibitor | Trypsin Inhibitor, <i>soybean</i> | |
| Ras-Lysepuffer: | Tris | 50 mM |
| | NaCl | 50 mM |
| | Glycerol | 10% (v/v) |
| | MgCl_2 | 5 mM |
| | EGTA | 1 mM |
| | NP-40 (Igepal CA630) | 1% (v/v) |
| | Protease Inhibitor Mix HP | 1x |
| | GST-Raf1-(RBD) | 20 $\mu\text{g/ml}$ |
| | GDP | 0,1 mM |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7,4 | |
| Lysepuffer: | Tris | 50 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | MgCl_2 | 1 mM |
| | Triton X-100 | 1% (v/v) |
| | Protease Inhibitor Mix HP | 1x |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7,4 | |

3.1.6 Aufreinigung und Modifizierung monoklonaler Antikörper

| | | |
|--------------------------|---|---------|
| Komplett-Medium: | RPMI | 1x |
| | FKS | 20% |
| | Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | β -Mercaptoethanol | 50 mM |
| | Interleukin-6 | 50 U/ml |
| | HAT | 1x |
| Chromatographie Säulen: | <i>Pierce Protein G Chromatography Cartridges</i> , 1ml <i>Illustra™ NAP™-5 Columns Sephadex™ G25</i> <i>HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution</i> | |
| Bindepuffer: | Natrium-Phosphat-Puffer, (pH=7,0) | 20 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ (0,2 M) | 39 ml |
| | Na ₂ HPO ₄ (0,2 M) | 61 ml |
| | ddH ₂ O | 100 ml |
| | 1:5 in ddH ₂ O verdünnen | |
| Elutionspuffer: | Glycin | 100 mM |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=2,7 | |
| Neutralisierungspuffer: | Tris | 1 M |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=9,0 | |
| 30% Ethanol | Ethanol, absolut | 30% |
| | ddH ₂ O | 70% |
| Natrium-Karbonat-Puffer: | Na ₂ CO ₃ (50 mM) | 1 Teil |
| | NaHCO ₃ (50 mM) | 4 Teile |
| | ergibt pH=9,6 | |
| PBS: | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,47 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 4,3 mM |
| | ddH ₂ O | |
| PBS-Tween: | PBS | |
| | Tween 20 | 0,1% |
| ELISA-Substrate: | <i>1-Step™ Ultra TMB-ELISA</i> <i>p-Nitrophenyl Phosphat</i> | |

| | | |
|--------------------------|---|---------------------------------------|
| TBS-Tween: | Tris NaCl KCl Tween 20 ddH ₂ O pH=7,6 | 25 mM 137 mM 2,7 mM 1% (v/v) |
| 2 M Schwefelsäure: | H ₂ SO ₄ ddH ₂ O | 2 M |
| Biotin: | Biotinamidocaproate-N-hydroxysuccimide Ester | |
| Peroxidase: | Meerettich Peroxidase | |
| Dialyse: | Dialysiergefäß Dialyseschlauch, 12-14 kDa, 14,3 mm | |
| Natriumcarbonat-Puffer: | NaHCO ₃ pH=8,5 | 1 M |
| | NaHCO ₃ pH=9,2 | 1 M |
| | NaHCO ₃ pH=9,2 | 0,1 M |
| | jeweils gelöst in ddH ₂ O | |
| Tris: | Tris ddH ₂ O pH=7,75 | 50 mM |
| Natriumacetat-Puffer: | Natriumacetat-Puffer (pH=4,0) | 50 mM |
| | Natriumacetat (0,2 M) | 9 ml |
| | Essigsäure (0,2 M) | 41 ml |
| | ddH ₂ O | 150 ml |
| Natriumperiodat: | NaIO ₄ ddH ₂ O | 0,2 M |
| Natriumborhydrid: | NaBH ₄ ddH ₂ O | 0.1 M |
| Natriumchlorid: | NaCl ddH ₂ O | 150 mM |
| Peroxidase-Stabisisator: | <i>StabilZyme</i> | |

3.1.7 SDS-PAGE

| | | |
|----------------------------------|---------------------|--------------|
| Laufpuffer: | Tris | 25 mM |
| | Glycin | 200 mM |
| | SDS | 1% (m/v) |
| | ddH ₂ O | |
| Trenngelpuffer (TGP): | Tris | 1,5 M |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=8,8 | |
| Sammelgelpuffer (SGP): | Tris | 0,5 M |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=6,8 | |
| 6xProbenpuffer: (reduzierend) | 0,5 M Tris (pH=6,8) | 7 ml |
| | Glycerin | 3 ml |
| | SDS | 10 % (m/v) |
| | DTT | 600 mM |
| | Bromphenolblau | Spatelspitze |

Tabelle 3: **Rezeptur für 10 ml Trenngel für die SDS-PAGE (TGP)** Trenngelpuffer, (A/B) Acrylamid/Bisacrylamid Lösung

| % | A/B (30%) | TGP | SDS (20%) | ddH ₂ O | APS (20%) | TEMED |
|----|-----------|---------|-----------|--------------------|-----------|-------|
| 10 | 3,33 ml | 1,90 ml | 50 µl | 4,80 ml | 40 µl | 4 µl |
| 15 | 5,00 ml | 1,90 ml | 50 µl | 3,10 ml | 40 µl | 4 µl |

Tabelle 4: **Rezeptur für 10 ml Sammelgel für die SDS-PAGE (SGP)** Sammelgelpuffer, (A/B) Acrylamid/Bisacrylamid Lösung

| % | A/B (30%) | TGP | SDS (20%) | ddH ₂ O | APS (20%) | TEMED |
|---|-----------|---------|-----------|--------------------|-----------|-------|
| 4 | 1,25 ml | 2,50 ml | 50 µl | 6,20 ml | 60 µl | 6 µl |

3.1.8 Western blot

| | | |
|-----------------|--------------------|--------------|
| Transferpuffer: | Tris | 48 mM |
| | Glycin | 39 mM |
| | SDS | 0,037% (m/v) |
| | Methanol | 15% (v/v) |
| | ddH ₂ O | |

Filterpapier: *Gel Blotting* Papier GB 005

PVDF Membran: Immobilion-P

Chemolumineszens Film: *Amersham HyperfilmTM ECL*

3.1.9 Immundetektion und Immunzytochemie- und -histochemie

| | | |
|------------|--------------------|------------|
| TBS-Tween: | Tris | 25 mM |
| | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | Tween 20 | 0,1% (v/v) |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7,6 | |

| | | |
|------------------|-----------|----------|
| BSA-Blockpuffer: | TBS-Tween | 1x |
| | BSA | 1% (m/v) |

| | | |
|--------------------|-------------|----------|
| Milch-Blockpuffer: | TBS-Tween | 1x |
| | Milchpulver | 5% (m/v) |

| | | |
|---------------|--|----------|
| Strip-Puffer: | Tris | 62 mM |
| | SDS | 2% (m/v) |
| | ddH ₂ O | |
| | β -Mercaptoethanol (frisch zugeben) | 100mM |

Luminol-Substrat: *SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrat*

| | | |
|---------------------------|------------------------------------|------------|
| PBS: | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,47 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 4,3 mM |
| | ddH ₂ O | |
| 4% Paraformaldehyd: | Tris | 25 mM |
| | NaCl | 137 mM |
| | Paraformaldehyd | 4% (m/v) |
| | ddH ₂ O | |
| Wasserstoffperoxidlösung: | TBS-Tween | 1x |
| | H ₂ O ₂ | 0,6% (v/v) |
| | TBS-Tween | 1x |
| | H ₂ O ₂ | 3% (v/v) |
| Ziegen Serum: | Ziegen Normal Serum | |
| Ethanol: | Ethanol | 70% |
| | ddH ₂ O | 30% |
| | Ethanol | 50% |
| | ddH ₂ O | 50% |
| Detektionssystem: | EnVision™ Detection System | |
| Einbettmedien: | <i>Glycerol Gelatine</i> | |
| | Roti@-Histokitt II | |
| Hämatoxilin-Lösung: | Hämatoxilin (lösen in Ethanol) | 0,1% (m/v) |
| | Ethanol | 1% |
| | KIO ₃ | 0,9 mM |
| | KAl(SO ₄) ₂ | 100 mM |
| | Chloralhydrat | 300 mM |
| | Zitronensäure | 0,5 mM |
| | ddH ₂ O | |
| Eosin-Lösung: | Eosin Y <i>solution, alcoholic</i> | |

Tabelle 5: Verwendete kommerzielle Antikörper Alle primären Antikörper wurden 1:1000 in BSA-Blockpuffer verdünnt und für die Immundetektion eingesetzt. Die entsprechenden sekundär Antikörper wurden für die jeweiligen Anwendungen unterschiedlich eingesetzt (jeweilige Konzentrationen siehe entsprechendes Methodenkapitel)

| Protein | Antikörper | Spezies | Anbieter |
|--------------|----------------------------------|-----------|----------------|
| EGF-Rezeptor | α -EGFR-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| | α -pEGFR(Y1068)-IgG | Kaninchen | Invitrogen |
| Erk1/2 | α -Erk1/2-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| | α -pErk1/2(T202/Y204)-IgG | Maus | Cell Signaling |
| FAK | α -FAK-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| | α -pFAK(Y397)-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| | α -pFAK(Y576/577)-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| | α -pFAK(Y925)-IgG | Kaninchen | Cell Signaling |
| Paxillin | α -Paxillin-IgG | Kaninchen | Santa Cruz |
| | α -pPaxillin(Y118)-IgG | Maus | Cell Signaling |
| Ras | α -panRas-IgG | Kaninchen | Calbiochem |
| | α -K-Ras-IgG | Maus | Santa Cruz |
| | α -N-Ras-IgG | Maus | Santa Cruz |
| | α -H-Ras-IgG | Maus | Santa Cruz |
| MMP14 | α -MMP14-IgG | Kaninchen | Abcam |
| IgG | α -Maus-IgG-HRP | Ziege | Dianova |
| | α -Maus-IgG-AP | Ziege | Dianova |
| | α -Kaninchen-IgG-HRP | Ziege | Dianova |

Tabelle 6: Im Labor generierte Antikörper für die Immundetektion, -cytochemie und -histochemie Die Antikörper gegen HPV45 E7 wurden in Milch-Blockpuffer und einer Konzentration von 1 μ g/ml für die Immundetektion eingesetzt. Die Konzentrationen für die Immunzytochemie variierten und sind der Tabelle zu entnehmen. Der Tetraspanin 1 Antikörper wurde für die Immundetektion sowie der Immunzyto- als auch Immunhistochemie in der angegebenen Konzentration eingesetzt.

| Protein | Antikörper | Spezies | Endkonzentration |
|---------------|---|---------|------------------|
| Tetraspanin 1 | α -Tetraspanin 1-IgG ₁ | Maus | 2 μ g/ml |
| HPV45 E7 | α -HPV45 E7-IgG _{2a} 4B11K3 | Maus | 0,1 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG _{2a} 5B4K2 | Maus | 0,1 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG ₁ 28A4 | Maus | 5 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG 36B8 | Maus | 5 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG 37C5 | Maus | 2 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG ₁ 54E4 | Maus | 1 μ g/ml |
| | α -HPV45 E7-IgG ₁ 54D11 | Maus | 1 μ g/ml |

3.1.10 Sandwich-ELISA zum Nachweis von HPV45 E7

| | | |
|--------------------|--|-------------|
| Lysepuffer: | Tris | 50 mN |
| | NaCl | 150 mM |
| | MgCl ₂ | 1 mM |
| | Triton X-100 | 1% (v/v) |
| | Protease Inhibitor Mix HP | 1x |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7,4 | |
| | | |
| Mikrotiterplatten: | <i>streptavidin coated 96 well microtiter plates</i> | |
| Antikörper-Puffer: | Tris | 50 mM |
| | NaCl | 200 mM |
| | BSA | 1% (m/v) |
| | γ-Globulin | 0,01% (m/v) |
| | MIT | 0,01% (m/v) |
| | Tween 20 | 0,1% (v/v) |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7.2 | |
| ELISA-Waschpuffer: | Tris | 50 mM |
| | NaCl | 200 mM |
| | Tween 20 | 0,1% (v/v) |
| | ddH ₂ O | |
| | pH=7.2 | |
| TMB-Substrat: | <i>1-StepTM Ultra TMB-ELISA</i> | |
| 2 M Schwefelsäure: | H ₂ SO ₄ | 2 M |
| | ddH ₂ O | |

3.2 Chemikalien und Materialien

| | |
|---|---------------------------|
| Acrylamid-Bis Fertiglösung 30% | Merck |
| <i>Amersham HyperfilmTM ECL</i> | GE Healthcare |
| Antikörper-Verdünnungslösung | Dako |
| <i>1-StepTM Ultra TMB-ELISA</i> | Thermo Scientific, Pierce |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| γ -Globulin, <i>from bovine blood</i> | Sigma-Aldrich |
| <i>Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free, *LDEV Free</i> | BD Bioscience |
| Biotinamidocaproate-N-hydroxysuccimide Ester | Sigma-Aldrich |
| Bromphenolblau | Merck |
| BSA | Sigma-Aldrich |
| <i>Cell Culture Inserts for 24-well plates, 8.0 μm, transparent PET membrane</i> | BD Bioscience |
| <i>CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay</i> | Promega |
| Chlorhydrat | Roth |
| Dialysiergefäß, <i>Micro Dialyzer</i> | Roth |
| Dialyseschlauch, 12-14 kDa, 14,3 mm | Medicell |
| DMEM | Life Technologies, Gibco |
| DMEM, Pulver (<i>low glucose, Pyruvat</i>) | Life Technologies, Gibco |
| DMSO | Serva |
| DTT | AppliChem |
| EDTA | Roth |
| EGF | Sigma-Aldrich |
| EGTA | Roth |
| Eosin Y <i>solution, alcoholic</i> | Sigma-Aldrich |
| EnVision TM Detection System | Dako |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol, absolut und 96% | Roth |
| FKS | Sigma-Aldrich |
| Fibronectin | Millipore |
| <i>Gel Blotting Papier GB 005</i> | Whatman |
| GDP | Sigma-Aldrich |
| <i>Glycerol Gelatine</i> | Serva |
| GlutaMAX TM , 100x | Life Technologies, Gibco |
| Glycin | Merck |
| Glycerol | Sigma-Aldrich |
| HAT | Sigma-Aldrich |
| H ₂ O ₂ | Sigma-Aldrich |
| H ₂ SO ₄ | Roth |
| Hematoxilin | Merck |
| HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution | GE Healthcare |
| Illustra TM NAP TM -5 Columns Sephadex TM G25 | GE Healthcare |
| Interleukin-6 | Roche |

| | |
|--|------------------------------|
| KCl | Roth |
| KH ₂ PO ₄ | Merck |
| KIO ₃ | Roth |
| KAl(SO ₄) ₂ | Roth |
| Kollagen Typ I und Typ III | Millipore |
| Kristallviolett | Merck |
| Laminin | Millipore |
| Meerettich Peroxidase | Sigma-Aldrich |
| Methanol | J.T. Baker |
| Milchpulver | Roth |
| MIT | Sigma-Aldrich |
| MgCl ₂ | Sigma-Aldrich |
| NaCl | Roth |
| Natriumacetat | Calbiochem |
| NaBH ₄ | Sigma-Aldrich |
| Na ₂ CO ₃ | Roth |
| NaHCO ₃ | Roth |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck |
| NaIO ₄ | Sigma-Aldrich |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck |
| NP-40 (Igepal CA-630) | Sigma-Aldrich |
| Nylon-Filter, 70 µm | BD Falcon |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich |
| <i>Pierce Protein G Chromatography Cartridges</i> , 1ml | Thermo Scientific, Pierce |
| PEG 1500 | Roche |
| Poly-L-Lysin | Sigma-Aldrich |
| Penicillin/Streptomycin | PAA |
| p-Nitrophenyl Phosphat | Sigma-Aldrich |
| Protease Inhibitor Mix HP | Serva |
| PVDF Membrane, Immobilion-P | Millipore |
| RPMI | Life Technologies, Gibco |
| Roti@-Histokitt II | Roth |
| SDS | Serva |
| <i>SeaPlaque Agarose</i> | Cambrex Bio Science |
| <i>StabilZyme</i> | SurModics |
| <i>streptavidin coated 96 well microtiter plates</i> | Fujirebio Diagnostics AB |
| Tris | Roth |
| Triton X-100 | Merck |
| Trypsin | Life Technologies, Gibco |
| Trypsin Inhibitor, <i>soybean</i> | Life Technologies, Gibco |
| TurboFect TM <i>in vitro</i> Transfection Reagent | Thermo Scientific, Fermentas |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich |
| TEMED | Merck |
| Ziegen Normal Serum | Dako |
| Zitronensäure | Sigma-Aldrich |

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zelllinien wurden, zum Schutz vor Kontaminationen, unter einer entsprechenden Sterilwerkbank und mit sterilisierten (autoklaviert oder sterilfiltriert) oder vom Hersteller steril gelieferten Materialien und Medien durchgeführt. Die Zelllinien wurden in einem Brutschrank mit 5% CO₂ Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert.

4.1.1 Auftauen einer Kryokonserven

Zur Langzeitlagerung der Zelllinien wurden diese in Einfriermedium, bei -196°C in flüssigen Stickstoff gelagert. Um eine Zelllinie in Kultur zu überführen wurde die Konserve bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu verdünnen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 250 g, bei Raum Temperatur zentrifugiert und der Mediumüberstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Die Kultur wurde auf 15 ml Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt und im Brutschrank kultiviert.

4.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 1, Seite 23) wurden in regelmäßigen Abständen passagiert um ein permanentes Wachstum zu gewährleisten. Hierzu wurden die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90 bis 100% Konfluenz der 75 cm² Kulturflasche vereinzelt. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium aus der Flasche abgesaugt und die Zellschicht mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen um Reste des Serum-haltigen Mediums zu entfernen. Hiernach wurden 0,5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für 5 bis 10 Minuten, je nach Zelllinie, im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen voneinander sowie vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 7,5 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden gründlich resuspendiert und in entsprechenden Verhältnissen weiter kultiviert. Die verbliebene Zellsuspension wurde weiter verwendet. Als Passagennummer wurden die zu erwartenden Zellteilungen bis zum erneuten Erreichen von ca. 95 bis 100% Konfluenz gezählt. Beispiel: passagiert man im Verhältnis 1:2, können sich die verbliebenen Zellen jeweils ein mal teilen, die Passagennummer wird um eins erhöht. Passagiert man im Verhältnis 1:4, können sich die verbliebenen Zellen zwei mal teilen, die Passagennummer wird um zwei erhöht, und so weiter.

4.1.3 Anlegen von Kryokonserven

Um, im Falle einer Kontamination oder Überalterung der Zelllinie, auf frühe Passagen zurück greifen zu können mussten Kryokonserven angelegt werden. Dazu wurden zunächst die Zellen einer 75 cm² Kulturflasche vom Flaschenboden abgelöst und durch Zentrifugation mit 250 g, bei Raumtemperatur pelletiert (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36). Die Zellen wurden anschließend in 2 ml Einfriermedium resuspendiert, auf zwei 2 ml Kryo-Gefäße aufgeteilt und umgehend über Nacht bei -80°C in einer Einfrierbox (Nalgene) eingefroren. Danach wurden die Konserven, bis zum späteren Bedarf, bei -196°C gelagert.

4.1.4 Zellzahlbestimmung

Um Vergleichbarkeit der Experimente untereinander zu gewährleisten war es notwendig die gleichen Zellzahlen einzusetzen. Dazu dienten die Thoma- oder Neubauer- Zählkammer. Dabei werden 10 µl der erhaltenen Zellsuspension (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36) in die Kammer pipettiert und die 4 Quadranten, bestehend aus je 16 Quadraten, ausgezählt und der arithmetische Mittelwert gebildet. Die erhaltene Zellzahl entspricht der Anzahl Zellen pro 0,1 µl (Volumen der Zählkammer). Somit konnte für jede Kulturschale innerhalb eines Experimentes sowie zwischen den Experimenten die gleichen Zellzahlen eingesetzt werden.

4.1.5 Gentransfer mittels Transfektion

Um die ektopische Expression von Proteinen in Zellen zu initiieren musste zunächst das entsprechende Gen enthaltene Plasmid in die Zelle eingebracht werden. Dies geschah durch Transfektion mit dem Reagenz „TurboFectTM *in vitro* Transfection Reagent“ (Fermentas). Zunächst wurden 5×10^5 Zellen in 4 ml Kulturmedium pro 60 mm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36 und 4.1.4, Seite 37). Am folgenden Tag wurde der Transfektionsansatz, bestehend aus 400 µl Serum-freiem Medium, 6 µl Transfektionsreagenz und 4 µg der entsprechenden Plasmid DNA (siehe Tabelle 2, Seite 24), für 20 Minuten bei Raum Temperatur inkubiert und anschließend Tropfenweise auf die Zellen in der 60 mm Zellkulturschale gegeben. Nach weiteren 24 Stunden Kultivierung wurden die transfizierten Zellen für die entsprechenden Experimente weiter verwendet.

4.1.6 Gentransfer mittels Adenoviren

Alternativ zum Gentransfer durch Transfektion mit Plasmid-DNA, wurden Adenoviren genutzt um das zu exprimierende Gen (siehe Tabelle 2, Seite 24) in die Zellen einzubringen. Dazu wurden 4×10^5 SiHa Zellen in 4 ml Kulturmedium pro 60 mm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36 und 4.1.4, Seite 37). Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 4 ml Kulturmedium,

welches die entsprechenden Viruspartikel in einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 enthielt, ersetzt. Nach 24 Stunden Kultivierung erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, um die Viruspartikel zu entfernen, und eine erneute Kultivierung für 24 Stunden. Hiernach wurden die Zellen für die entsprechenden Experimente weiter verwendet.

4.1.7 Invasions Assay

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurden „Transwell“ Versuche mit MatrigelTM beschichteten Zellkultur Einsätzen (8 μm Porengröße im 24 Lochplatten Format) durchgeführt. Dazu wurde das MatrigelTM zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend 1:3 in eiskaltem Serum-freien Medium verdünnt. Sowohl die Zellkultur Einsätze als auch die Pipettenspitzen wurden vor Benutzung bei -20°C gelagert um ein zu schnelles gelieren des Matrigel zu vermeiden. Anschließend wurden 30 μl verdünntes MatrigelTM auf die Oberseite der Membran pipettiert, gleichmäßig verteilt und für 30 Minuten bei 37°C , zum gelieren, im Brutschrank gelagert. Währenddessen wurden die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und eine Zellsuspension mit 5×10^5 Zellen/ml hergestellt. Hiernach wurde die untere Kammer mit 500 μl Kulturmedium befüllt, der Zellkultur Einsatz Luftblasenfrei eingesetzt und die obere Kammer mit 200 μl Kulturmedium, welches 10^5 Zellen enthielt, befüllt. Nach 72 Stunden Kultivierung wurde das Medium der oberen Kammer abgesaugt, die Unterseite des Zellkultur Einsatzes einmal in ddH₂O gewaschen und anschließend 20 Minuten, bei 4°C in vorgekühltem 70%-igem Ethanol inkubiert um die daran haftenden Zellen zu fixieren. Hiernach erfolgten zwei Waschschrte in ddH₂O, nachdem die Zellkultur Einsätze getrocknet waren erfolgte ein Färbeschritt in 0,1% Kristallviolett für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem waschen in ddH₂O wurden die gefärbten Zellen in 200 μl 10%-iger Essigsäure lysiert. Die Bestimmung der optischen Dichte bei 630 nm erfolgte im Photospektrometer, dabei ist die gemessene optische Dichte ein Maß für die Zellzahl. [134] Es wurden vier voneinander unabhängige Experimente in vier-fach Bestimmung durchgeführt und die erhaltenen Datengruppen statistisch ausgewertet (siehe Kapitel 4.5, Seite 50).

4.1.8 Proliferations Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde das „CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ nach Herstellerangaben verwendet. Von vitalen Zellen wird dabei 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) , ein Tetrazoliumsalz, zu einem Formazan reduziert. Dabei entsteht ein Farbumschlag von farblos zu blauviolett. Die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) wurden zunächst vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und eine Zellsuspension mit 4×10^5 Zellen/ml hergestellt. Es

wurden 2×10^5 Zellen in 500 μl Kulturmedium in 24 Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte eine Hungerphase für 16 Stunden, dazu erfolgte ein Mediumwechsel zu Serum-freiem Medium, um die Zellen in die G_0 Phase des Zellzyklus zu überführen. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 500 μl /Loch Serum-freies Medium ersetzt. Nach der Hungerphase erfolgte ein weiterer Mediumwechsel zu 500 μl /Loch Kulturmedium um die Proliferation der Zellen durch die Serumkomponenten zu stimuliert. Mit Hilfe des „CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ wurde zum Zeitpunkt der Stimulation (0 Stunden) und nach sechs, 24, 48 sowie 72 Stunden der Substratumsatz gemessen und somit indirekt die Proliferation bestimmt. Dazu wurden 75 μl /Loch des Substrates zu den Zellen gegeben, diese für eine Stunde im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μl /Loch Stopplösung gestoppt, die Lösung gründlich durch auf- und abpipettieren resuspendiert und photospektrometrisch bei 570 nm vermessen. Die optische Dichte ist dabei ein Maß für die Proliferation der Zellen. Zur detaillierten Analyse wurden vier voneinander unabhängige Experimente in Doppelbestimmung nach sechs Stunden durchgeführt. Es erfolgte eine multiplikative Normalisierung und statistische Auswertung der somit erhaltenen Datengruppen (siehe Kapitel 4.5, Seite 50).

4.1.9 Kolonie Formations Assay

Zur Bestimmung der Kontakt-unabhängigen Zellproliferation wurden Kolonie Formationsversuche durchgeführt. Hierbei wachsen die Zellen, nicht adhärent, in einer Agaroseschicht und bilden Kolonien, statt einer adhärennten Zellschicht aus. Hierfür wurde pro Vertiefung einer 6-Lochplatte 5 ml einer 0,5%-igen Serum-haltigen Agaroselösung gegeben. Dazu wurde zunächst 1% Agarose in sterilem ddH₂O erhitzt und gelöst, anschließend wurde die Agaroselösung zu gleichen Teilen mit 2xDMEM Kulturmedium gemischt, in die Vertiefung gegossen und für 3 Stunden bei Raumtemperatur zum gelieren aufbewahrt. Anschließend wurde diese Agaroseschicht mit 3 ml einer 0,3%-igen Serum-haltigen Agaroseschicht, welche 5×10^4 Zellen enthielt, überschichtet. Dazu wurden zunächst 0,9% Agarose in sterilem ddH₂O erhitzt und gelöst, und zusammen mit 2xDMEM Kulturmedium bis zum Gebrauch auf 42°C temperiert. Die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) wurden zunächst vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und eine Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml hergestellt. Hiernach wurden die 0,9%-ige Agaroselösung, das 2x DMEM Kulturmedium und die Zellsuspension zu gleichen Teilen gemischt und 3 ml davon auf die 0,5%-ige Agaroseschicht gegossen. Die Zellen wurden abschließend über drei Wochen im Brutschrank kultiviert und danach die Anzahl und Größe der gebildeten Kolonien durch Mikroskopie bewertet. Es wurden vier voneinander unabhängige Experimente in drei-fach Bestimmung durchgeführt.

4.1.10 Adhäsions Assay

Zur Analyse der Adhäsionsfähigkeit der Zellen wurden zunächst die Vertiefungen einer 96-Lochplatte mit jeweils 100 μl einer 150 $\mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin-Lösung und 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin, Laminin, Kollagen Typ I und III Lösung, alle gelöst in PBS, über Nacht bei Raum Temperatur beschichtet. Hiernach wurde die Proteinlösung entfernt, freie Bindungsstellen für eine Stunde, bei Raumtemperatur, mit 100 μl einer 2%-igen BSA Lösung, ebenfalls in PBS gelöst, blockiert und abschließend zwei mal mit 200 μl PBS gewaschen. Die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) wurden zunächst vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und eine Zellsuspension mit 2×10^5 Zellen/ml hergestellt. Anschließend wurden pro Vertiefung 100 μl der jeweiligen Zellsuspension gegeben und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurde das Kulturmedium abgesaugt, die adhären Zellen zwei mal mit 200 $\mu\text{l/Loch}$ PBS gewaschen, fünf Minuten mit 50 $\mu\text{l/Loch}$ 0,1% Kristallviolett gefärbt und erneut zwei mal mit 200 $\mu\text{l/Loch}$ PBS gewaschen. Abschließend erfolgte die Lyse der gefärbten Zellen mit 100 $\mu\text{l/Loch}$ 10%-iger Essigsäure und der Bestimmung der optischen Dichte bei 630 nm mittels Photospektrometer, die optische Dichte war hierbei ein Maß für die Zellzahl. Es wurden vier voneinander unabhängige Experimente in vier-fach Bestimmung durchgeführt. Die gewonnen Daten wurden statistisch ausgewertet (siehe Kapitel 4.5, Seite 50).

4.1.11 Stimulationsversuche mit EGF und ECM Proteinen

Um spezielle Signalwege zu aktivieren und ausgewählte Signalproteine zu untersuchen wurden die Zellen zum einen mit dem Wachstumsfaktor EGF und zum anderen mit den Extrazelluläre Matrix Komponenten Fibronektin, Laminin und Kollagen Typ I sowie III stimuliert.

Für die Stimulation mit EGF wurden SiHa Zellen wie unter Kapitel 4.1.6 (Seite 37) beschrieben mittels Adenoviren transduziert. Anschließend erfolgte eine Hungerphase in Serum-freiem Medium für 16 Stunden, um die Zellen in die G_0 Phase des Zellzyklus zu überführen. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 4 ml Serum-freies Medium ersetzt. Die Stimulation mit 100 ng/ml EGF erfolgte bei 120, 60, 30 und 10 Minuten (bei SiHa) und 120, 60, 30, 15 und 5 Minuten (bei HeLa), durch direkte Zugabe in das Serum-freie Medium, als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Medium gründlich abgesaugt und die Zellen in 500 μl eiskaltem Ras-Lysepuffer lysiert. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und das Lysat mittels Zellschaber gründlich vom Kulturschalenboden entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 20000 g und 4°C wurde das Klarlysat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die Stimulation über Integrine mit Proteinen der extrazellulären Matrix wurden 60

mm Zellkulturschalen mit jeweils 1 ml einer 150 $\mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin-Lösung und 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin, Laminin, Kollagen Typ I und III Lösung, jeweils gelöst in PBS, über Nacht bei Raum Temperatur beschichtet. Hiernach wurde die Proteinlösung entfernt, freie Bindungsstellen für eine Stunde, bei Raumtemperatur, mit 1 ml einer 2%-igen BSA Lösung, ebenfalls in PBS gelöst, blockiert und abschließend zwei mal mit 2 ml PBS gewaschen. Die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) wurden 16 Stunden in Serum-freiem Medium, wie oben beschrieben, gehungert und vom Kulturschalenboden abgelöst. Dazu wurde zunächst das Medium gründlich abgesaugt, 500 μl Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 4,5 ml Serum-freiem Medium, versetzt mit 2% BSA und 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin Inhibitor (Gibco), resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und eine Zellsuspension mit 3×10^5 Zellen/ml, in dem zum resuspendieren verwendeten Medium, hergestellt. Hiernach wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C unter Rotation bei 15 U/min inkubiert um durch Zell-Zell-Kontakte aktivierte Signalwege zu deaktivieren. Anschließend wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension pro beschichtete Zellkulturschale pipettiert und diese für zwei Stunden im Brutschrank zur Adhäsion der Zellen inkubiert. Hiernach wurde das Medium gründlich abgesaugt und die Zellen in 500 μl eiskaltem Ras-Lysepuffer lysiert. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und das Lysat mittels Zellschaber gründlich vom Kulturschalenboden entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünf Minuten Zentrifugation mit 20000 g, bei 4°C wurde das Klarlysate in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2 Aufreinigung und Modifizierung monoklonaler Antikörper

Die Generierung der monoklonalen Antikörper erfolgte zum einen in Kooperation mit Dr. Matthias Görlach und Thomas Seiboth vom Leibnitz Institut für Alterforschung Jena, Abteilung Biomolekulare NMR Spektroskopie, welche das rekombinante HPV45 E7 Q18 Protein, was für die Immunisierung verwendet wurde, zur Verfügung stellte [113], und zum anderen mit Dr. Oliver Frey vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikum Jena, wo die Immunisierung der DBA/-1 Mäuse durchgeführt wurde.

Die Bezeichnung HPV45 E7 Q18 bedeutet das es sich um das HPV45 E7 Protein ab der Aminosäure 18 handelt, die ersten 17 Aminosäuren des N-Terminus fehlten bei diesem rekombinant hergestelltem Protein. Die Mäuse wurden initial mit 100 μg HPV45 E7 Q18 in komplettem Freundschem Adjuvanz immunisiert und alle 14 Tage mit 100 μg HPV45 E7 Q18 in inkomplettem Freundschem Adjuvanz aufgefrischt. Nach acht bis zehn Wochen wurden die Milz sowie Lymphknoten der immunisierten Mäuse zerkleinert und durch Filtration durch einen 70 μm Nylon Filter eine Einzelzellsuspension in Serum-freiem RPMI gewonnen. Nach einem Waschschrift in 50 ml Serum-freiem RPMI wurde die Zellzahl bestimmt und im Verhältnis 3:1 mit X63 Zellen gemischt und erneut in 50 ml Serum-freiem

RPMI gewaschen. Für die Zellfusion wurde das Zellpellet nach Zentrifugation für drei Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 1 ml 37°C warmes 50% PEG 1500 tropfenweise im Verlauf einer Minute, unter leichtem schütteln, zugegeben. Hiernach wurde die Zellsuspension 45 Sekunden ohne schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend zwei mal in 50 ml Serum-freiem RPMI und einmal in 50 ml Komplett-Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem Liter Komplett-Medium resuspendiert und zu je 100 µl/Loch auf 96-Lochplatten verteilt. Die Antikörper produzierenden Klone (siehe Kapitel 4.2.1, Seite 42) wurden Schrittweise an RPMI mit 10% FKS gewöhnt und expandiert.

Die somit generierten Hybridomzelllinien wurden in Zukunft mit RPMI mit 10% FKS, welches zuvor über Protein G voraufgereinigt wurde (siehe unten), in einem Brutschrank mit 5% CO₂ Gehalt, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert. Die in Suspension wachsenden Zellen wurden dabei alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:2 passagiert.

Um für die spätere Aufreinigung der monoklonalen Antikörper keine Verunreinigungen durch Serumbestandteile zu erhalten, wurde das FKS zuvor über Protein G voraufgereinigt. Dazu wurden 50 ml FKS 1:3 in Serum-freiem RPMI verdünnt, mittels 0,45 µm Filter filtriert, um ein verstopfen der Säule durch im Serum enthaltene Partikel zu vermeiden, und über *fast protein liquid chromatography* (FPLC) bei einer Flussrate von einem ml/min aufgereinigt. Dazu wurde die Chromatographiesäule „*Pierce Protein G Chromatography Cartridges*, 1ml“ luftblasenfrei an die Apparatur (BioLogic LP, BioRad) angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer equilibriert. Hiernach erfolgte das auftragen des verdünnten FKS, wobei das gewünschte Permeat gesammelt wurde. Die Säule wurde gereinigt durch einem Waschschriff mit 20 Säulenvolumen Bindepuffer. Nach Elution der gebundenen Serumbestandteile mit Elutionspuffer wurde die Säule erneut mit 20 Säulenvolumen Bindepuffer und anschließend zur Lagerung mit fünf Säulenvolumen 30%-igem Ethanol gespült. Währenddessen wurde das zuvor gesammelte Permeat mittels eines 0,2 µm Filter steril filtriert und mit Serum-freiem RPMI auf 10% FKS haltiges Kulturmedium aufgefüllt.

4.2.1 Identifizierung Antikörper produzierender Hybridome

Um Antikörper-produzierende Hybridomzelllinien zu identifizieren wurden die Kulturüberstände der wachsenden Hybridome mittels einfachen ELISA getestet. Alle Inkubationsschritte zur Antikörper Bindung erfolgten für eine Stunde bei Raumtemperatur. Jeder Waschschriff bestand aus fünf Einzelschritten mit jeweils 200 µl/Loch PBS-Tween.

Zunächst wurden das rekombinante HPV45 Q18 in 100 µl 50 mM Natrium-Karbonat-Puffer (pH=9,6) mit einer Konzentration von 2 µg/ml über Nacht bei 4°C in 96-Loch-Mikrotiterplatten immobilisiert. Danach erfolgte ein Blockierungsschriff mit 200 µl 0,2% BSA in PBS-Tween für eine Stunde bei 37°C. Anschließend erfolgte die Bindung der im Kulturmedium enthalten Antikörper, dazu wurden das Kulturmedium 1:3 in 0,2% BSA in PBS-Tween verdünnt und 100 µl/Loch für eine Stunde bei Raumtemperatur in der

beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Hiernach folgte ein Waschschrift und danach der Bindungsschrift mit 100 μl /Loch anti-Maus-IgG-AP mit einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, zur späteren Detektion, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Abschließend wurde mit 100 μl /Loch p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP) für eine Stunde inkubiert und die optischen Dichte bei 405 nm mittels Photospektrometer bestimmt. Die so detektierten Antikörper produzierenden Hybridomzelllinien wurden weiter expandiert und konserviert (siehe Kapitel 4.1.3, Seite 37).

4.2.2 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Zellkulturmedium

Um die von den Hybridomzellen sezernierten monoklonalen Antikörper aus dem voraufgereinigtem Kulturmedium (siehe Kapitel 4.2, Seite 41) zu gewinnen, wurden sie mittels Protein G *fast protein liquid chromatography* (FPLC) abgetrennt, für alle Schritte wurde dabei eine Flussrate von einem ml/min verwendet. Dazu wurde der Kulturüberstand zunächst mittels 0,45 μm Filter filtriert um ein verstopfen der Säule durch im Medium enthaltene Partikel zu vermeiden. Die Chromatographiesäule „Pierce Protein G Chromatography Cartridges, 1ml“ wurde Luftblasenfrei an die Apparatur (BioLogic LP, BioRad) angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen Bindepuffer equilibriert. Hiernach erfolgte das auftragen des Kulturmediums und ein Waschschrift mit 20 Säulenvolumen Bindepuffer. Nach Elution mit Elutionspuffer wurde das Eluat in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt und die Säule zur Reinigung erneut mit 20 Säulenvolumen Bindepuffer und anschließend zur Lagerung bei 4°C mit fünf Säulenvolumen 30%-igem Ethanol gespült. Der saure pH-Wert des Eluates wurde durch Zugabe von 1 M Tris (pH=9,0) (Endkonzentration 0,1 M) neutralisiert und die Antikörper anschließen mittels Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurde tropfenweise 4 M Ammoniumsulfat im Verhältnis 1:2 zum Eluat gegeben (Endkonzentration 2 M) und über Nacht bei 4°C gefällt. Nach zehn Minuten Zentrifugation mit 3000 g, bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und das Antikörperpellet in 100 bis 500 μl PBS resuspendiert sowie die Konzentration mittels Photospektrometer bestimmt, durch weitere Zugabe von PBS wurde die Konzentration der Antikörperlösung auf 1 bis 2,5 mg/ml eingestellt. Bis zur Verwendung wurden die Antikörper bei -80°C gelagert.

4.2.3 Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Um den Immunglobulin (IgG) Isotyp der generierten monoklonalen Antikörper zu bestimmen wurde das „ImmunoPure® Monoclonal Antibody Isotyping Kit II (AP/PNPP)“ (Thermo Scientific, Pierce) nach Herstellerangaben verwendet.

4.2.4 Antikörpermodifikation (Biotin- und Peroxidase- Konjugation)

Um für den *Sandwich*-ELISA einsetzbare Antikörper zur Verfügung zu stellen mussten die Antikörper mit Biotin beziehungsweise mit Meerrettich Peroxidase (HRP, *horsera-*

dish peroxidase) gekoppelt werden, um einen enzymatischen Nachweis nach Antikörper-Antigen-Bindung durchführen zu können.

Biotin-Konjugation, Methode 1:

Mit dieser Methode wurden die Antikörper zum Einsatz als sekundär Antikörper im *Sandwich*-ELISA, beschrieben in Kapitel 4.2.5 auf Seite 45, biotinyliert.

Dazu wurden die aufgereinigten Antikörper (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 43) im Masseverhältnis 10:1 mit Biotinamidocaproate-N-hydroxysuccimide Ester, in DMSO gelöst, für zwei Stunden bei Raumtemperatur konjugiert und anschließend durch Dialyse in PBS das ungebundene Biotin entfernt. Dazu wurde der Kopplungsansatz in ein Dialysiergefäß gegeben und dieses mit einer Dialysemembran mit 12-14 kDa Porengröße verschlossen. Anschließend erfolgten 3 Dialyseschritte in jeweils 500 ml PBS für eine Stunde bei 4°C. Die Antikörperkonzentration wurde mittels Photospektrometer bestimmt und die Antikörper bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Biotin-Konjugation, Methode 2:

Mit dieser Variante wurde der, für den ELISA zum Nachweis von HPV45 E7 eingesetzte, Antikörper Klon 54D11 biotinyliert. Er diente zur Immobilisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes an die Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (siehe Kapitel 4.3.5, Seite 48)

Zur Biotinylierung wurde der Antikörper Klon 54D11 nach Aufreinigung und Fällung (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 43) mit einer Konzentration 2,5 mg/ml in PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 1 M Natrium Karbonat Puffer (pH=8,5) (Endkonzentration 0,1 M) wurde der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Anschließend wurde in einem 7,5-fachen molekularen Überschuss Biotinamidocaproate-N-hydroxysuccimide Ester, gelöst in DMSO, zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung ungebundenen Biotins wurde der Reaktionsansatz mittels „IllustraTM NAPTM-5 Columns SephadexTM G25“ Gel Chromatographie Säulen, zuvor mit 10 ml 50 mM Tris (pH=7,75) equilibriert, aufgereinigt. Die biotinylierten Antikörper wurden mit einem ml 50 mM Tris (pH=7,75) eluiert, die Konzentration mittels Photospektrometer bestimmt, und zur Stabilisierung mit 5 mg/ml BSA versetzt. Die Antikörper wurden bei -80°C bis zur Benutzung gelagert.

Peroxidase-Konjugation:

Um im ELISA zum Nachweis von HPV45 E7 den Antikörper-Antigen Komplex enzymatisch detektieren zu können (siehe Kapitel 4.3.5, Seite 48), wurde mit dieser Methode der Antikörper Klon 5B4K2 mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt.

Zur Peroxidase-Konjugation wurde der Antikörper Klon 5B4K2 nach Aufreinigung und Fällung (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 43) ebenfalls mit einer Konzentration 2,5 mg/ml in PBS resuspendiert. Zunächst wurde die Meerrettich Peroxidase mit einer Konzentration von 10 mg/ml in ddH₂O gelöst und durch Zugabe von 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH=4,0)

(Endkonzentration 8.3 mM) wurde der pH-Wert auf 4,0 eingestellt. Durch Zugabe von 0,2 M Natriumperiodat (Endkonzentration 28 mM) und einer Inkubation für 15 Minuten bei Raum Temperatur im Dunkeln, wurde die Peroxidase zur Kopplung an die NH₂-Gruppe des Antikörpers oxidiert. Die oxidierte Peroxidase wurde wie oben beschrieben mittels „Illustra™ NAP™-5 Columns Sephadex™ G25“ Gel Chromatographie Säulen aufgereinigt und mit 1 ml 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH=9,2) eluiert. Der pH-Wert der Antikörperlösung wurde durch Zugabe von 1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH=9,2) (Endkonzentration 0,1 M) ebenfalls auf 9,2 eingestellt und anschließend wurden Antikörper und Peroxidase im Masseverhältnis 1:2 miteinander gemischt und für zwei Stunden bei Raum Temperatur im Dunkeln inkubiert, wobei die oxidierte Peroxidase kovalent an den Antikörper bindet. Um den Komplex zu stabilisieren erfolgte eine Reduktion durch Zugabe von, frisch hergestelltem, 0,1 M Natriumborhydrit (Endkonzentration 2,5 mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abschließend erfolgte die Aufreinigung über Gel Chromatographie mittels einer „HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution“ Säule bei einer Flussrate von 5 ml/min. Dazu wurde zunächst die Säule mit zwei Säulen Volumen 150 mM Natriumchlorid equilibriert, der Reaktionsansatz aufgetragen und anschließen mit 150 mM Natriumchlorid eluiert. Die Konzentration der erhaltenen Fraktionen wurde mittels Photospektrometer bestimmt und zur Peroxidase Stabilisierung im Verhältnis 1:2 mit „StabilZyme“ (SurModics) versetzt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.5 Identifizierung des optimalen Antikörper-Paares für den *Sandwich*-ELISA

Für den *Sandwich*-ELISA sind zwei Antikörper nötig die in der Lage sind das Antigen an jeweils zwei unterschiedlichen Positionen zu binden. Um zu untersuchen welche Antikörperpaarung das beste Resultat im *Sandwich*-ELISA erzielt wurden alle erhaltenen Antikörper Klone miteinander auf Funktionalität getestet.

Alle Inkubationsschritte zur Antigen, Antikörper und Streptavidin-HRP Bindung erfolgten für eine Stunde bei Raumtemperatur in 100 µl/Loch 2% BSA gelöst in TBS-Tween mit einer Konzentration von 1 µg/ml für Antigen und Antikörper und 0,5 µg/ml für Streptavidin-HRP. Jeder Waschschrift bestand aus drei Einzelschritten mit jeweils 200 µl/Loch TBS-Tween.

Zunächst wurden die jeweiligen Antikörper in 100 µl/Loch 50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH=9,6) mit einer Antikörperkonzentration von 2 µg/ml über Nacht bei 4°C in 96-Loch-Mikrotiterplatten immobilisiert. Danach erfolgte ein Blockierungsschritt mit 200 µl/Loch 2% BSA in TBS-Tween für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend erfolgte die Bindung des rekombinanten HPV45 Q18 gefolgt von einem Waschschrift. Hiernach folgte der Bindungsschritt mit den entsprechenden zweiten, biotinylierten Antikörpern (siehe Kapitel 4.2.4, Methode 1, Seite 43) gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Abschließend wurde zur enzymatischen Detektion mit Streptavidin-HRP inkubiert und nach einem

letzten Waschschrift mit 50 μ l „1-StepTM Ultra TMB-ELISA“ für 1 Minute auf dem Plattenschüttler bei 600 U/min inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt und die optischen Dichte bei 450 nm mittels Photospektrometer bestimmt.

4.3 Arbeiten zum Nachweis von Proteinen

4.3.1 Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE wurden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Entsprechend der Größe des Zielproteins wurden Gele mit 10% und 15% Acrylamid Anteil verwendet, dabei galt je größer ein Protein desto niedriger der Acrylamid Anteil.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, nach der Aushärtung wurde das 4%-ige Sammelgel gegossen und ebenfalls ausgehärtet (Rezepturen siehe Tabelle 3, Seite 29 und Tabelle 4, Seite 29). Die Zelllysate wurden im Verhältnis 1:5 mit 6xProbenpuffer versetzt und acht Minuten bei 95°C erhitzt, danach wurden sie in die Taschen des Gels pipettiert. Die Proteine wurden mittels eines Tris/Glycin Laufpuffer unter einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel aufgetrennt, bis die Lauffront die Unterseite des Gels erreichte.

4.3.2 Western Blot

Nach Trennung der zu untersuchenden Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichts mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 46) wurden sie zur späteren Immundetektion (siehe Kapitel 4.3.3, Seite 46) mittels eines elektrischen Feldes im *semi-dry* Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran transferiert. Dazu wurden zunächst sechs Lagen Filterpapier sowie die PVDF Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, die PVDF Membran 15 Sekunden in Methanol aktiviert, und anschließend, mit dem Filterpapier, in Transferpuffer equilibriert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel ebenfalls zehn Minuten in Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurde das Transferpaket aus drei Lagen Filterpapier, die PVDF Membran, das Gel und erneut drei Lagen Filterpapier übereinander geschichtet und die dabei eingeschlossenen Luftblasen ausgewalzt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von einem mA pro cm² Membranfläche für 45 Minuten.

4.3.3 Immundetektion

Nach erfolgtem Proteintransfer durch *Western Blot* (siehe Kapitel 4.3.2, Seite 46) erfolgte der Nachweis der Zielproteine durch Markierung mit spezifischen Antikörpern.

Dazu wurde zunächst die PVDF Membran in 15 ml Milch- oder BSA-Blockpuffer für 30 Minuten bei 37°C blockiert, dadurch wurden alle freien Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 15 ml des primären Antikörpers,

im entsprechenden Blockpuffer, über Nacht bei 4°C, (siehe Tabelle 5, Seite 32). Nach einem Waschriff von drei mal 5 Minuten in TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit 15 ml des entsprechenden Peroxidase-konjugiertem sekundärem Antikörper, im entsprechenden Blockpuffer mit einer Konzentration von 0,05 ng/ml, für 30 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Waschriff von drei mal 5 Minuten in TBS-Tween. Hier-nach wurde mittels Luminol-Substrat und Röntgenfilm in der Dunkelkammer detektiert. Um nach erfolgter Detektion auf der selben Membran andere Proteine beziehungsweise das Gesamtprotein, nach vorheriger Detektion der phosphorylierten Form, nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper entfernt. Dazu wurde die Membran 30 Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml Stripp-Puffer inkubiert, anschließend gründlich mit ddH₂O gespült und zwei mal fünf Minuten in TBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Immundetektion erneut.

4.3.4 Immunzytochemie und -histochemie

Immunzyto- und Immunhistochemie dienen dem Nachweis von Proteinen in intakten Zellen oder Geweben. Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Immunzytochemie wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen mittels Zentrifugation auf einen Objektträger gebracht. Dazu wurden die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 37 und Kapitel 4.1.6, Seite 37) zunächst vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36) und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37). Die Zellen wurden fünf Minuten mit 250 g, bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert in einer Zellkonzentration von 10⁵ Zellen pro 150 µl. Durch Zentrifugation für zwei Minuten mit 500 U/min bei Raumtemperatur mit der Zentrifuge *CellSpin* (Tharmac) wurden 150 µl der Zellsuspension auf den Objektträger transferiert. Hiernach erfolgte die Fixierung der Zellen durch 4% Paraformaldehyd für zehn Minuten, gefolgt von einem Blockierungsschritt intrazellulärer Peroxidasen mittels 0,6%- Wasserstoffperoxid Lösung, in TBS-Tween, für sieben Minuten. Nach der Blockierung mit 1:5 in TBS-Tween verdünntem Ziegen Normal Serum, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des sekundär Antikörpers, für 20 Minuten, erfolgte die Inkubation mit primärem Antikörper (siehe Tabelle 6, Seite 32) in Antikörper-Verdünnungslösung für eine Stunde im Falle des Tetraspanin 1 Nachweises und für zwei Stunden im Falle des HPV E7 Nachweises. Nach einem Waschriff von 5 Minuten mit TBS-Tween erfolgte die Detektion mit dem „EnVisionTM Detection System“ nach Herstellerangaben.

Für die Immunhistochemie wurden Paraffin eingebettete und eingefrorene Gewebe untersucht. Es wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger transferiert. Zur Antikörpermarkierung der nachzuweisenden Proteine, sowie Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung), an Paraffin eingebetteten Geweben war zuvor eine Entparaffinierung und Rehydrierung nötig. Dazu erfolgten zwei Inkubationsschritte für jeweils fünf Minuten in Xylol gefolgt von jeweils fünf Minuten Inkubation in einer absteigenden Etha-

nol Reihe (absolut, 96%, 70% und 50%).

Der weitere Nachweis mittels Antikörpermarkierung erfolgte wie oben beschrieben ab der Blockierung der intrazellulären Peroxidasen, mit dem Unterschied, dass für Paraffin eingebettetes Gewebe 3%-ige statt 0,6%-ige Wasserstoffperoxid Lösung verwendet wurde.

Die Färbung mit Hämatoxinilin, nach Antikörpermarkierung und für die HE-Färbung, zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte für fünf Minuten in Hämatoxinilin-Lösung. Danach wurden die Objektträger gründlich in Leitungswasser gespült und für weitere fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Die immunhistochemisch gefärbten Gewebe wurden anschließend mit *Glycerol Gelatine* Einbettmedium eingebettet. Die Objektträger für die HE-Färbung wurden, nach dem bläuen, für fünf Minuten in Eosin-Lösung, zur Visualisierung des Zytoplasma, gefärbt. Hiernach erfolgte eine Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96% und absolut) für jeweils zwei Minuten gefolgt von zwei Inkubationsschritten in Xylol für jeweils fünf Minuten. Die Gewebe nach HE-Färbung wurden anschließend in Roti@-Histokitt II Lösung eingebettet.

4.3.5 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von HPV45 E7

Zum Nachweis des HPV45 Onkoproteins E7 über zwei spezifische Antikörper im *Sandwich*-ELISA System wurde zunächst der Antikörper Klon 54D11 Biotinyliert und Klon 5B4K2 mit Peroxidase gekoppelt (siehe Kapitel 4.2.4, Seite 43).

Für die Etablierung und Validierung des ELISA wurden neben rekombinant hergestelltem HPV45 E7 Protein zum einen Lysate von Zervixkarzinomzelllinien und transfizierte COS-7 Zellen (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 37) verwendet. Dazu wurden die Zellen nach Transfektion beziehungsweise aus der Kultur vom Kulturgefäßboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36) und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37). Die Zellen wurden fünf Minuten mit 250 g, bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet mit 10^4 Zellen/ μ l mit Lysepuffer lysiert, zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Lysat fünf Minuten mit 20000 g, bei 4°C zentrifugiert. Es wurde in jedem Reaktionsansatz Lysat von 10^5 Zellen eingesetzt, bei Verdünnungsreihen HPV-positiver Zellen wurde entsprechend auf die Gesamtzellzahl mit HPV-negativen Zervixkarzinom Zellen (C33A), und das Gesamtprobenvolumen mit Lysepuffer auf 25 μ l, aufgefüllt. Zum anderen wurden Lysate aus gefrorenem Tumormaterial eingesetzt. Hierzu wurde das Einbettmedium soweit wie möglich entfernt da es die Reaktion störte. Anschließend wurden zehn Schnitte je 10 μ m Dicke angefertigt und in 50 μ l Lysepuffer lysiert und zur Abtrennung der Zelltrümmer für fünf Minuten mit 20000 g, bei 4°C zentrifugiert. Als Probe wurden ebenfalls 25 μ l eingesetzt.

Des weiteren wurden Lysate aus Zellabstrichen der Ekto- und Endozervix von 223 Patientinnen gesammelt und auf Vorhandensein von HPV45 E7 untersucht. Die Abstrichbürst-

chen wurden in 500 μ l Lysepuffer gegeben und lagerten über die Dauer der Sprechstunde, circa zwei bis drei Stunden, bei Raum Temperatur. Anschließend wurden die Bürstchen entfernt, das Lysat zur Abtrennung der Zelltrümmer fünf Minuten mit 20000 g, bei 4°C zentrifugiert und das Klarlysate bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für den Nachweis von HPV45 E7 wurden zunächst 25 μ l der entsprechenden Probe in Streptavidin-beschichtete 96-Loch Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend 75 μ l Antikörperpuffer welcher 1 μ g/ml anti-HPV45 E7-IgG-Biotin (Klon 54D11) und 2 μ g/ml anti-HPV45 E7-IgG-HRP (Klon 5B4K2) enthielt, zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur und 600 U/min auf einem Plattenschüttler. Abschließend erfolgte ein Waschschriff (sechs mal mit je 700 μ l pro Vertiefung) mit ELISA-Waschpuffer in einem Plattenwaschgerät (Wellwash 4 MK 2, Thermo Scientific) und die Detektion mittels 50 μ l „1-StepTM Ultra TMB-ELISA“ für 30 Minuten auf dem Plattenschüttler bei 600 U/min. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt und die optischen Dichte bei 450 nm mittels Photospektrometer bestimmt.

4.4 Analyse der Expression von Matrix Metalloproteinasen

Die Analyse der Expression der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) erfolgte in Kooperation mit Dr. Jelena Anacker aus der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universität Würzburg nach den dort etablierten Methoden [87]. Die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6, Seite 37) wurden zunächst vom Kulturschalenboden abgelöst (siehe Kapitel 4.1.2, Seite 36), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.1.4, Seite 37) und nach Zentrifugation mit 250 g, bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren und auf Trockeneis, für die Analysen in Würzburg, versandt. Weiterhin wurden die Gewebe Arrays für die immunhistochemische Untersuchung der MMP Expression versandt.

Für die vor Ort durchgeführte Immundetektion (siehe Kapitel 4.3.3, Seite 46) von MMP14 nach SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 46) und *Western Blot* (siehe Kapitel 4.3.2, Seite 46) wurden die Zellen nach Gentransfer (siehe Kapitel 4.1.6) verwendet. Dazu wurde das Kulturmedium gründlich abgesaugt und die Zellen mit 500 μ l Lysepuffer lysiert. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und das Lysat mittels Zellschaber gründlich vom Kulturschalenboden entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach fünf Minuten Zentrifugation mit 20000 g, bei 4°C wurde das Klarlysate in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.5 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Messdaten wurden zwei parameterfreie statistische Tests (Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Parameterfreie statistische Tests sind unabhängig von der Verteilung der Messwerte, was nötig ist, da auf Grund der technischen und biologischen Schwankungen ebenfalls die Messwerte zwischen und innerhalb der durchgeführten Experimenten variieren können.

Der Kruskal-Wallis-Test diente zur Untersuchung von mehr als zwei, und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Analyse von zwei voneinander unabhängiger Datengruppen. Die Auswertung erfolgte mit der Software „SPSS Statistics 19“ (IBM).

5 Ergebnisse

5.1 ELISA zum Nachweis des HPV45 Onkoproteins E7

Die derzeitigen diagnostischen Methoden zur Vorsorgeuntersuchung des Zervixkarzinoms sind zum einen die zytologische Untersuchung von Zellabstrichen und zum anderen der Nachweis von HPV-DNA. Bei der Erkennung schwer-gradiger Neoplasien erweisen sich jedoch beide Methoden als mangelhaft [38]. Zur Verbesserung der Früherkennung schwer-gradiger Neoplasien (CIN2 und höher) könnte der Nachweis von Proteinen dienen, die mit der Zervixkarzinogenese einhergehen. Das virale Onkoprotein E7 ist maßgeblich an der Transformation der HPV infizierten Epithelzelle beteiligt [55]. Eine Methode zum Nachweis des E7 Proteins könnte die bisher angewandten diagnostischen Methoden ergänzen und damit den positive Vorhersagewert potentiell verbessern.

5.1.1 Generierung monoklonaler Antikörper gegen HPV45 E7

Um, für die Entwicklung eines Nachweissystems für das virale Onkogen E7 auf Basis eines *Sandwich-Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (Sandwich-ELISA)*, spezifische monoklonale Antikörper zu generieren, wurden zunächst DBA/1 Mäuse mit rekombinant hergestellten HPV45 E7 Protein immunisiert und anschließend Hybridomzelllinien generiert (siehe Kapitel 4.2, Seite 41). Die Zelllinien wurden anschließend auf die Produktion von Antikörpern untersucht (siehe Kapitel 4.2.1, Seite 42) und, für die Aufreinigung der ins Kulturmedium sezernierten Antikörper, expandiert. Es konnten sieben verschiedene Antikörper-produzierende Zellklone generiert werden, deren sezernierte Antikörper nach Aufreinigung über Protein G (siehe Kapitel 4.2.2, Seite 43) einer Isotypen Bestimmung unterzogen (siehe Kapitel 4.2.3, Seite 43) und auf ihre Funktionalität für Immundetektion sowie Immunzyto und -histochemie hin untersucht wurden (siehe Kapitel 4.3.3, Seite 46 und Kapitel 4.3.4, Seite 47). Weiterhin wurden sie, für die Entwicklung des *Sandwich-ELISA* zunächst biotinyliert (siehe Kapitel 4.2.4, Seite 43) und, zur Identifizierung der optimalen Antikörper Paarung, in einem *Sandwich-ELISA*, miteinander kombiniert (siehe Kapitel 4.2.5, Seite 45).

Während alle generierten HPV45 E7 spezifischen monoklonalen Antikörper für die Immunzytochemie einsetzbar waren, zeigten sich nur vier von sieben tauglich für die Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* und sechs von sieben einsetzbar für den *Sandwich-ELISA*. Keiner der sieben Antikörper war anwendbar für die Immunhistochemie (siehe Tabelle 7, Seite 52).

Ein wesentlicher Aspekt war die Spezifität der Antikörper gegen das Onkoprotein E7 des HPV Typs 45. Mittels der Immunzytochemie (siehe Kapitel Kapitel 4.3.4, Seite 47) an der Zelllinie COS-7, welche nach Transfektion (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 37) mit Plasmiden die jeweils die E7 Gene der HPV Typen 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 trugen, die entsprechenden E7 Proteine exprimierten, wurden die generierten monoklonalen An-

tikörper auf Kreuzreaktivität hin untersucht. Alle sieben Antikörperklone waren in der Lage HPV45 E7 zu binden. Darüber hinaus ergab sich für die vier Klone, 28A4, 36B8, 54E4 und 54D11 eine Kreuzreaktivität zu HPV18 E7. Keiner der sieben Antikörperklone zeigte eine Kreuzreaktivität gegen über den E7 Proteinen der HPV Typen 16, 31, 33, 52 und 58 (siehe Tabelle 8, Seite 52).

Tabelle 7: Verwendungsmöglichkeiten der generierte monoklonalen Antikörper gegen HPV45 E7. Die generierten monoklonalen Antikörper gegen das HPV45 Onkoprotein E7 wurden für ihre Verwendbarkeit bei der Immundetektion, Immunzyto- und -histochemie sowie für den Einsatz im *Sandwich*-ELISA überprüft. Mit Ausnahme der Immunhistochemie sind die generierten Antikörper für alle Methoden geeignet und einsetzbar. Für Immunhistochemie (IHC), Immunzytochemie (IZC) und *Sandwich*-ELISA bedeuten + anwendbar und - nicht anwendbar. Für die Immundetektion (ID) geben ++ ein starkes, + ein schwaches und - kein detektierbares Signal an. Nicht durchgeführt ist mit n.d. abgekürzt.

| Klon | Isotyp | IHC | IZC | <i>Sandwich</i> -ELISA | ID |
|--------|-------------------|-----|-----|------------------------|----|
| 4B11K3 | IgG _{2a} | - | + | + | ++ |
| 5B4K2 | IgG _{2a} | - | + | + | ++ |
| 28A4 | IgG ₁ | - | + | - | - |
| 36B8 | n.d. | - | + | + | - |
| 37C5 | n.d. | - | + | + | - |
| 54E4 | IgG ₁ | - | + | + | + |
| 54D11 | IgG ₁ | - | + | + | + |

Tabelle 8: Kreuzreaktivität der generierte monoklonalen Antikörper gegen das HPV E7 Protein. Um die HPV-Typ Spezifität der generierten monoklonalen Antikörper gegen E7 zu testen, wurden die entsprechenden Gene durch Transfektion in COS-7 Zellen eingebracht und diese für immunzytochemische Färbungen eingesetzt. Für die Kreuzreaktivität bedeutet + das der Antikörper das Protein bindet und - das er nicht bindet.

| Klon | HPV-Typ | negativ | 16 | 18 | 31 | 33 | 45 | 52 | 58 |
|------|---------|---------|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | | | | | | | |
| | 4B11K3 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | 5B4K2 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | 28A4 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | 36B8 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | 37C5 | - | - | - | - | - | + | - | - |
| | 54E4 | - | - | + | - | - | + | - | - |
| | 54D11 | - | - | + | - | - | + | - | - |

Die generierten monoklonalen Antikörper waren über den für sie bestimmten Anwendungsbereich ebenfalls für die Detektion des HPV45, sowie HPV18 E7 Proteins für die vier oben genannten Klone, bei der Immunzytochemie sowie der Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* einsetzbar. Die Kreuzreaktivität der vier Klone gegenüber

dem zu HPV45 stark verwandtem HPV18 E7 Protein, erlaubt es diese Klone ebenfalls für dessen Nachweis zu nutzen, was den Anwendungsbereich dieser Antikörper erweitert. Neben der diagnostischen Nutzung könnten die Antikörper ebenfalls für verschiedene Methoden zu Forschungszwecken eingesetzt werden, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Im Vordergrund dieses Teils der Arbeit stand die Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA zum Nachweis von HPV45 E7. Dazu wurden alle generierten Antikörper miteinander im *Sandwich*-ELISA kombiniert um die Paarung zu finden welche den besten Nachweis erbringt. Die beiden Klone mit den stärksten Bindungseigenschaften gegen HPV45 E7 im *Sandwich*-ELISA waren die Klone 5B4K2 und 54D11 und wurden für die weiteren Versuche, zur Optimierung hinsichtlich der Zahl der Arbeitsschritte sowie der Zeitdauer, verwendet.

5.1.2 Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA zum Nachweis von HPV45 E7

Für den zu entwickelnden *Sandwich*-ELISA mussten die beiden Antikörperklone zum einen eine hohe Bindung an das HPV45 Onkoprotein E7 aufweisen, und zum anderen in Kombination miteinander anwendbar sein. Die beiden Klone 5B4K2 und 54D11 erwiesen sich für beide Voraussetzungen als am besten geeignet. Neben der Optimierung der Reaktionsbedingungen stand ebenfalls ein an Arbeitsschritten minimiertes Protokoll im Vordergrund der Entwicklung. Dazu wurde zunächst die zum enzymatischen Nachweis verwendete Meerrettich Peroxidase direkt an den Klon 5B4K2 gekoppelt (siehe Kapitel 4.2.4, Seite 43). Dadurch entfiel ein Inkubationsschritt zur Bindung der Peroxidase nach Antigenmarkierung. Des weiteren sollte eine Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Antikörper und anschließender Blockierung entfallen. Dazu wurde Klon 54D11 an Biotin gekoppelt (siehe Methode 2 Kapitel 4.2.4, Seite 43) damit dieser an kommerziell erhältliche Straptavidin beschichtete Mikrotiterplatten binden konnte. Beide Antikörpermodifikationen erlaubten es in einem Inkubationsschritt sowohl das Antigen, HPV45 E7, zu binden und an die Mikrotiterplatte zu immobilisieren. Anschließend wurden das Puffersystem und die Inkubationszeit optimiert. Durch Variation der NaCl Konzentration wurde die Spezifität der Antikörper-Antigenbindung verbessert und somit das Hintergrundsignal reduziert. Weiterhin erwies sich ein Phosphat gepuffertes System als ungeeignet, weswegen eine Tris gepufferte Antikörperlösung zur Anwendung kam. Durch schütteln bei 600 U/min wurde ebenfalls die Antikörper-Antigen-Bindung verbessert und eine Inkubation für zwei Stunden ergab den besten Nachweis für das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18.

Nach Abschluss dieser Arbeitsschritte wurde zunächst an Zellkulturmodellen der Nachweis von HPV45 E7 erbracht. Dazu diente die HPV45 positive Zervixkarzinom Zelllinie MS751. Als Kontrolle für unspezifische Reaktionen und eventuelle Kreuzreaktivität, dienten die Zervixkarzinomzelllinien CaSki, HPV16 positiv, und HeLa, HPV18 positiv,

sowie die HPV-negative Zervixkarzinom Zelllinie C33A. Jede Probe aus Zelllysaten entsprach einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen, die aus C33A allein, beziehungsweise C33A und 5000 Zellen der jeweiligen HPV-positiven Zellen bestand. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien wurde ausschließlich MS751 als positiv detektiert (Abbildung 11, Seite 54).

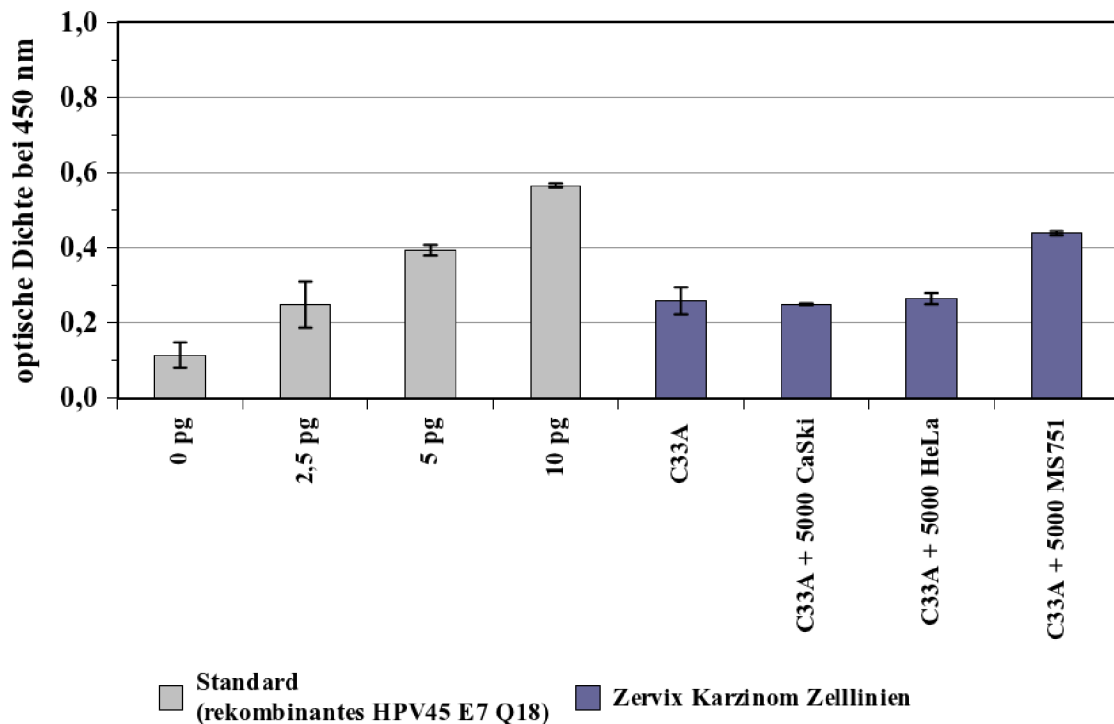


Abbildung 11: **HPV45 E7 wird mittels des Sandwich-ELISA aus Lysaten der Zervixkarzinom Zelllinie MS751 nachgewiesen.** Die Gesamtzellzahl jeder Probe beträgt 10^5 Zellen, die jeweils 5000 Zellen der jeweiligen HPV-positiven Zelllinien wurden mit C33A Zellen aufgefüllt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus der HPV45 positiven Zervixkarzinom Zelllinie MS751 im Hintergrund HPV-negativer C33A Zervixkarzinom Zellen detektiert werden. Als Kontrolle dienten Zellen der Zervixkarzinomzelllinien C33A (HPV-negativ) CaSki (HPV16 positiv) und HeLa (HPV18 positiv). Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein verwendet.

Neben Zervixkarzinomzelllinien wurde ebenfalls die Zelllinie COS-7 für den Test des Sandwich-ELISA verwendet. In COS-7 wurden, durch Transfektion (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 37) mit Plasmid DNAs für die E7 Gene für die HPV Typen 16, 18 und 45, die verschiedenen E7 Proteine ektopisch exprimiert. Anschließend wurden die Lysate für den HPV45 E7 Nachweis im Sandwich-ELISA eingesetzt. Auch bei diesen Versuchen entsprach jede Zelllysate Probe einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen. Wie mit den Zervixkarzinomzelllinien, konnte auch mit diesem Modell HPV45 E7 spezifisch in den entsprechenden COS-7 Zellen detektiert werden. Das starke Signal resultiert aus der hohen Menge an HPV45 E7 durch die Überexpression, bedingt durch die Transfektion. Die HPV16

E7 und HPV18 E7 exprimierenden sowie Leervektor transfizierten COS-7 ergaben kein positives Signal (Abbildung 12, Seite 55).

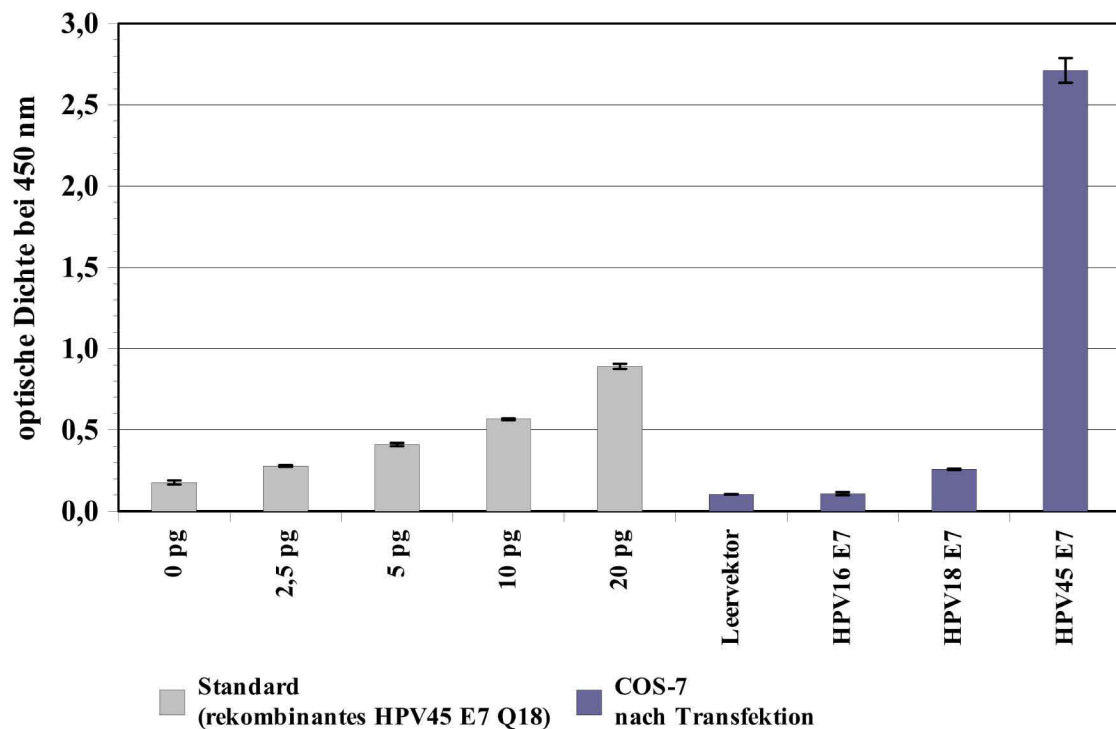


Abbildung 12: **HPV45 E7 wird mittels des *Sandwich*-ELISA aus Lysaten HPV45 exprimierenden COS-7 Zellen nachgewiesen.** Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus HPV45 exprimierenden COS-7 Zellen detektiert werden. Als Kontrolle dienten mit dem Leervektor transfizierte COS-7 sowie HPV16 und 18 E7 exprimierende COS-7 Zellen. Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein verwendet. Jede Probe aus Zelllysaten entspricht einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen.

Der entwickelte *Sandwich*-ELISA konnte, ausgehend von Zelllysaten, HPV45 E7 erfolgreich detektieren. Als nächster Schritt erfolgte der Nachweis des Proteins aus Biopsiematerial von HPV45 positiven, und als Kontrolle, HPV16 positiven Zervixkarzinomen. Aus Gefriermaterial von 12 HPV45 positiven und 11 HPV16 positiven Tumoren wurden Lysate gewonnen und im *Sandwich*-ELISA eingesetzt, jede Probe entspricht fünf Gewebeschnitten mit je 10 μ m Dicke. Von den HPV45 positiven Zervixkarzinom Geweben zeigten sechs von zwölf ein stärkeres Signal als die HPV16 positiven. Vier der sechs Proben mit einem geringen Signal wiesen einen Tumoranteil von unter 20% auf, was wiederum die Menge an HPV45 E7 Protein reduziert. Des weiteren kann eine Verzögerung beim einfrieren der Gewebe nach Operation Ursache für einen Abbau von Proteinen bedeuten, was auch die starken Schwankungen der detektierten Gewebeproben erklären könnte, deren Intensität nicht mit dem Tumoranteil korrelierten (Abbildung 13, Seite 56).

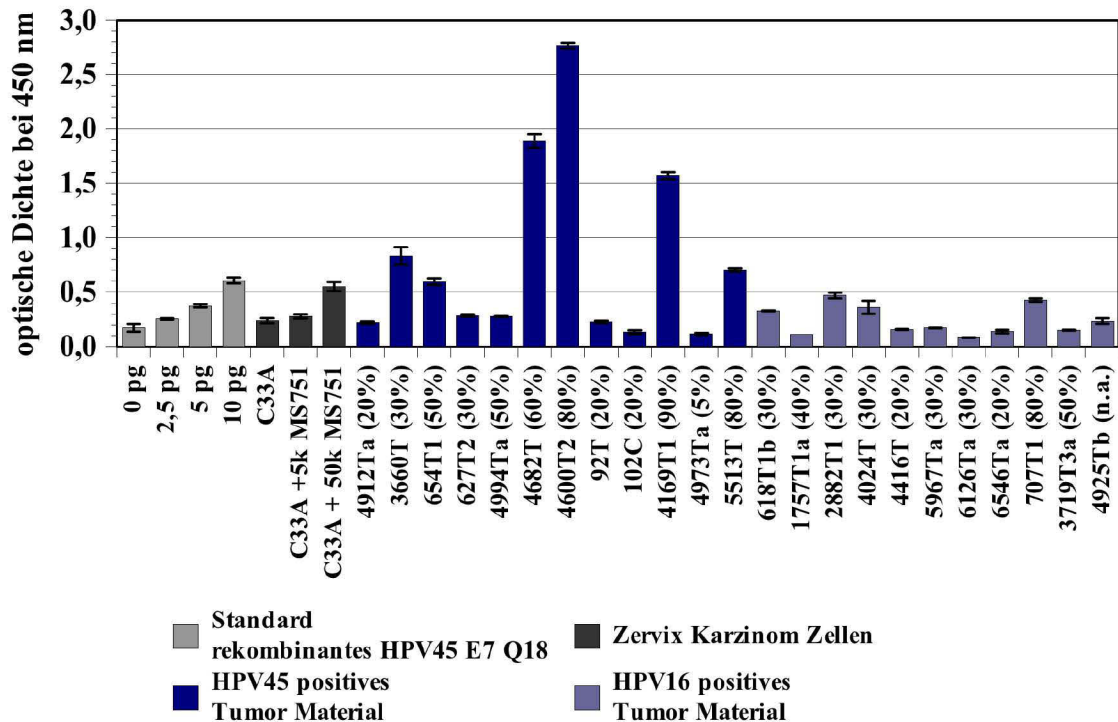


Abbildung 13: **HPV45 E7 wird mittels des *Sandwich*-ELISA aus Lysaten von HPV45 positiven Zervixkarzinomgeweben nachgewiesen.** Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte HPV45 E7 aus Biopsiematerial HPV45 positiver Zervixkarzinome nachgewiesen werden, als Kontrolle diente Gewebe von HPV16 positiven Zervixkarzinomen. Als Standard wurde das rekombinant hergestellte HPV45 E7 Q18 Protein, sowie die Zervix Karzinom Zelllinie MS751 als Kontrolle verwendet. Jede Probe aus Zelllysaten entspricht einer Gesamtzellzahl von 10^5 Zellen und jede Probe aus Biopsiematerial entspricht fünf Schnitten mit je 10 μ m Dicke.

Es wurde mit den generierten monoklonalen Antikörpern ein *Sandwich*-ELISA etabliert und die Versuchsbedingungen soweit optimiert das ein Minimum an Arbeitsschritten, bei einem Zeitaufwand von circa drei bis vier Stunden, erforderlich für den Nachweis von HPV45 E7 ist. Es konnte, anhand von Lysaten aus Zelllinien sowie Zervixkarzinom-Gewebeproben, gezeigt werden das der *Sandwich*-ELISA spezifisch HPV45 E7 detektiert und keine Kreuzreaktivität zu HPV16 oder HPV18 E7 aufweist. Bei einer Aufbewahrung der Lysate bei -80°C konnte auch nach 16 Wochen Lagerung kein Verlust der Signalintensität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der entwickelte *Sandwich*-ELISA könnte somit als Testsystem für den HPV45 E7 Nachweis von routinemäßig entnommen Patientenproben dienen.

5.1.3 Validierung des HPV45 E7 *Sandwich*-ELISA mittels zervikalen Abstrichproben

Nach erfolgreicher Entwicklung und Optimierung eines *Sandwich*-ELISA zum Nachweis von HPV45 E7 aus Zell- und Gewebelysaten, wurde die Tauglichkeit des Testsystems zur

Untersuchung von klinischen Proben überprüft. Im Vorfeld wurde anhand der HPV45 positiven Zervixkarzinom Zelllinie MS751 ein Schwellenwert festgelegt, ab dem eine Probe als positiv gewertet wurde. Dazu wurde mittels einer Standardkurve mit rekombinantem HPV45 E7 Q18 ein Grenzwert, ausgehend vom Messwert bei 450 nm, von 5000 MS751 Zellen errechnet. Der so ermittelte Schwellenwert betrug 160 pg/ml, den eine Probe überschreiten musste um als positiv gezählt zu werden. Die zu analysierenden Proben wurden im Rahmen der routinemäßigen Vorsorgeuntersuchung entnommen. Dazu wurde ein zusätzlicher Zellabstrich der Ekto- und Endozervix von 223 Patientinnen gesammelt und das daraus gewonnene Zelllysate untersucht. Bei jeder Messung wurde eine Standardreihe mit rekombinantem HPV45 E7 Q18 mitgeführt und damit die entsprechende E7 Protein Konzentration jeder Probe errechnet. Anhand der standardmäßig entnommen Proben erfolgte eine HPV-Genotypisierung sowie eine zytologische und histopathologische Begutachtung der potentiellen Neoplasien für jede Patientin. Während die Hälfte der gesammelten Proben HPV-negativer Patientinnen entstammten, waren die meisten, mit 21,3%, HPV16 positiv. Sieben Patientinnen waren HPV45 positiv und der Rest verteilte sich auf die übrigen *high risk* beziehungsweise *low risk* HPV Typen (Tabelle 9, Seite 57).

Tabelle 9: HPV Prävalenz in den gesammelten zervikalen Abstrichproben. Durch Genotypisierung wurde der HPV Typ jeder Patientin bestimmt. Dabei wurden Doppelinfektionen für jeden HPV Typ einzeln gezählt. Alle *high risk* HPV Typen die nicht HPV16, 18, 31, 33, 45, 52 oder 58 waren wurden unter HR zusammengefasst. Die *low risk* HPV positiven Proben wurden unter LR zusammen gefasst.

| HPV-Typ | Anzahl | % |
|---------|--------|-------|
| 16 | 49 | 21,5 |
| 18 | 3 | 1,3 |
| 31 | 10 | 4,4 |
| 33 | 1 | 0,4 |
| 45 | 7 | 3,1 |
| 52 | 3 | 1,3 |
| 58 | 6 | 2,6 |
| HR | 29 | 12,7 |
| LR | 4 | 1,8 |
| negativ | 116 | 50,9 |
| gesamt | 228 | 100,0 |

Die histologische Bewertung ergab, dass 198 der 223 Patientinnen histologisch unauffällig waren und 23 Patientinnen CINs der Stufen I bis III sowie zwei ein Zervixkarzinom aufwiesen (Tabelle 10, Seite 58).

Fünf der sieben HPV45 positiven Patientinnen wiesen dabei keine Neoplasie auf, während jeweils eine CIN I sowie eine CIN I-II vertreten waren (Tabelle 11, Seite 58).

Tabelle 10: **Histologische Einstufung zu den gesammelten zervikalen Abstrichproben.** Bei Verdacht auf eine Neoplasie, nach der kolposkopischen Begutachtung, wurde im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung eine Biopsie entnommen und anschließend histopathologisch untersucht.

| Histologie | Anzahl |
|--------------|--------|
| normal | 198 |
| CIN I | 6 |
| CIN I - II | 4 |
| CIN II | 5 |
| CIN II - III | 4 |
| CIN III | 4 |
| Karzinom | 2 |
| gesamt | 223 |

Tabelle 11: **Zuordnung des HPV-Status zu der Histologie der gesammelten klinischen Proben.** Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der histologischen Einstufung der Patientinnen zu den entsprechenden HPV-Typen für die untersuchten Proben. Alle *high risk* HPV Typen die nicht HPV 16, 18 und 45 waren wurden unter HR zusammengefasst.

| Histologie \ HPV-Typ | HPV-Typ | | | |
|----------------------|---------|----|----|----|
| | 16 | 18 | 45 | HR |
| normal | 30 | 1 | 5 | 48 |
| CIN I | 4 | | 1 | 1 |
| CIN I - II | | 2 | 1 | |
| CIN II | 4 | | | 1 |
| CIN II - III | 4 | | | |
| CIN III | 4 | | | 1 |
| Karzinom | 2 | | | |

Von den 223 untersuchten Proben wurden, entsprechend des vorher festgelegten Schwellenwertes, insgesamt acht Proben als positiv detektiert. Unter diesen acht Proben befand sich eine tatsächlich HPV45 positive Probe, zwei Proben mit anderem *high risk* HPV-Typ sowie 5 HPV-negative Proben (Tabelle 12, Seite 59). Die als positiv gewertete HPV45 positive Probe war histopathologisch als CIN I eingestuft, die als CIN I - II bewertete Probe konnte nicht detektiert werden (Tabelle 13, Seite 59).

Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Bestimmung der Test-Validität im Vergleich zum HPV-DNA-Test als Referenztest Unter den 223 getesteten Proben befanden sich sieben HPV45 positive Proben. Davon wurde eine auch als solche detektiert, weiterhin wurden zwei Proben anderen HPV Typs sowie fünf HPV-negative Proben als positiv detektiert. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 14,3% und eine Spezifität von 96,8%.

| HPV45-DNA \ HPV45 Protein | ja | nein | Summe |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| ja | (richtig positiv) 1 | (falsch positiv) 7 | 8 |
| nein | (falsch negativ) 6 | (richtig negativ) 214 | 220 |
| Summe | 7 | 221 | 228 |
| | (Sensitivität) 14,3% | (Spezifität) 96,8% | |

Tabelle 13: Vierfeldertafel zur Bestimmung der Test-Validität im Vergleich zum histologischen Befund Unter den 223 getesteten Proben befanden sich zwei HPV45 positive, leicht-gradige CIN, sowie fünf HPV45 positive aber histologisch unauffällige Patientinnen. Von den als normal eingestuften Proben wurde keine und von den zwei leicht-gradigen CIN wurde eine als solche erkannt. Daraus ergibt sich, hinsichtlich der Histologie, eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 100%.

| histologisch auffällig \ HPV45 Protein | ja | nein | Summe |
|--|------------------------|------------------------|-------|
| ja | (richtig positiv) 1 | (falsch positiv) 0 | 1 |
| nein | (falsch negativ) 1 | (richtig negativ) 5 | 6 |
| Summe | 2 | 5 | 7 |
| | (Sensitivität) 50% | (Spezifität) 100% | |

Mittels des entwickelten *Sandwich*-ELISA wurden, hinsichtlich der HPV-DNA-Genotypisierung als Referenzmethode, 214 Proben als richtig HPV45 negativ und sieben als falsch HPV45 positiv erkannt. Daraus ergab sich eine Spezifität von 96,8%. Weiterhin wurde eine richtig HPV45 positive und 6 falsch HPV45 negative Proben ermittelt, woraus sich eine Sensitivität von 14,3% ergab. Da allerdings von den insgesamt sieben HPV45-DNA positiven Proben nur zwei eine Neoplasie aufwiesen und davon eine detektiert wurde ergab sich hinsichtlich der Histologie eine Sensitivität von 50%, bei einer Spezifität von 100%, da keine der histologisch unauffälligen Proben detektiert wurde.

Aufgrund der Tatsache das insgesamt nur sieben HPV45 positive Proben, und davon nur zwei eine Neoplasie aufwiesen, zur Verfügung standen, lässt sich eine sichere Validierung

des *Sandwich*-ELISA mit den untersuchten Proben nicht durchführen. Das entwickelte Nachweissystem ist in der Lage das HPV45 E7 Protein zu detektieren und könnte eine Ergänzung zu bestehenden und angewandten Testsystemen zur Diagnose von zervikalen intraepithelialen Neoplasien darstellen.

5.2 Die Rolle von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom

5.2.1 Tetraspanin 1 wird in Bereichen des Zervixkarzinoms exprimiert welche potentiell eine erhöhte Proliferation und/oder Zellbeweglichkeit aufweisen

Die Expression von Tetraspanin 1 beginnt in Zellen schwer-gradiger zervikaler intraepithelialer Neoplasien (CIN) und setzt sich in Zervixkarzinomzellen fort. Vorangegangene immunhistochemische Untersuchungen von Gewebeschnitten zeigten eine inhomogene Expression von Tetraspanin 1 innerhalb des Tumorgewebes (unveröffentlichte Daten). Um Anhaltspunkte über mögliche Funktionen von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom zu erhalten, wurden Gewebe-Arrays aus Normalgewebe der Zervix, CIN1 bis CIN3 sowie Zervixkarzinomgeweben immunhistochemisch untersucht.

Mit Zunahme der Schwere der Neoplasie sowie im Zervixkarzinom, verschiebt sich das Kern-Plasma-Verhältnis der Zelle in Richtung Zellkern, was durch die Färbung mit Hämatoxilin und Eosin (HE) gezeigt wurde. Weiterhin wird infolge der HPV-Infektion und einer verstärkten Zunahme der E7 Expression mit fortschreitendem Schweregrad das Protein p16^{INK4a} überexprimiert (siehe Kapitel 1.3, Seite 5). Ein immunhistochemischer Nachweis von p16^{INK4a} erfolgte um die dysplastischen Gewebebereiche sowie die Tumoreareale zu visualisieren.

Neben dem bereits beobachteten Expressionsmuster von Tetraspanin 1 in den präkanzerösen Vorstufen [182], bestätigte sich ebenfalls die inhomogene Expression in geschlossenen Geweberealen von Tumoren sowie CIN3. Darüber hinaus zeigte sich eine verstärkte Expression von Tetraspanin 1 an der Wachstumsfront neoplastischer Areale, jedoch nicht im umliegenden Gewebe der CIN3, beziehungsweise des Tumors (Abbildung 14, Seite 61). Diese spezifische Expression von Tetraspanin 1 im Gewebe könnte auf eine mögliche Beteiligung von Tetraspanin 1 an der Proliferation oder Zellbeweglichkeit von schwergradig, dysplastischen Zellen sowie Karzinomzellen hindeuten.

5.2.2 Tetraspanin 1 steigert die Invasivität von Zervixkarzinomzellen

Aufgrund der beobachteten Expression von Tetraspanin 1 an der Wachstumsfront von CIN3 sowie Karzinomgewebe sollte untersucht werden ob Tetraspanin 1 an der Regulation der Zellbeweglichkeit beteiligt ist. Dazu wurde das Invasionsverhalten der Zervixkarzinomzelllinien SiHa und HeLa in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression analysiert. Beide Zelllinien exprimieren kein Tetraspanin 1. Durch Transfektion (siehe Kapitel 4.1.5, Seite 37) bei HeLa, beziehungsweise adenoviralen Gentransfer bei SiHa (siehe Kapitel

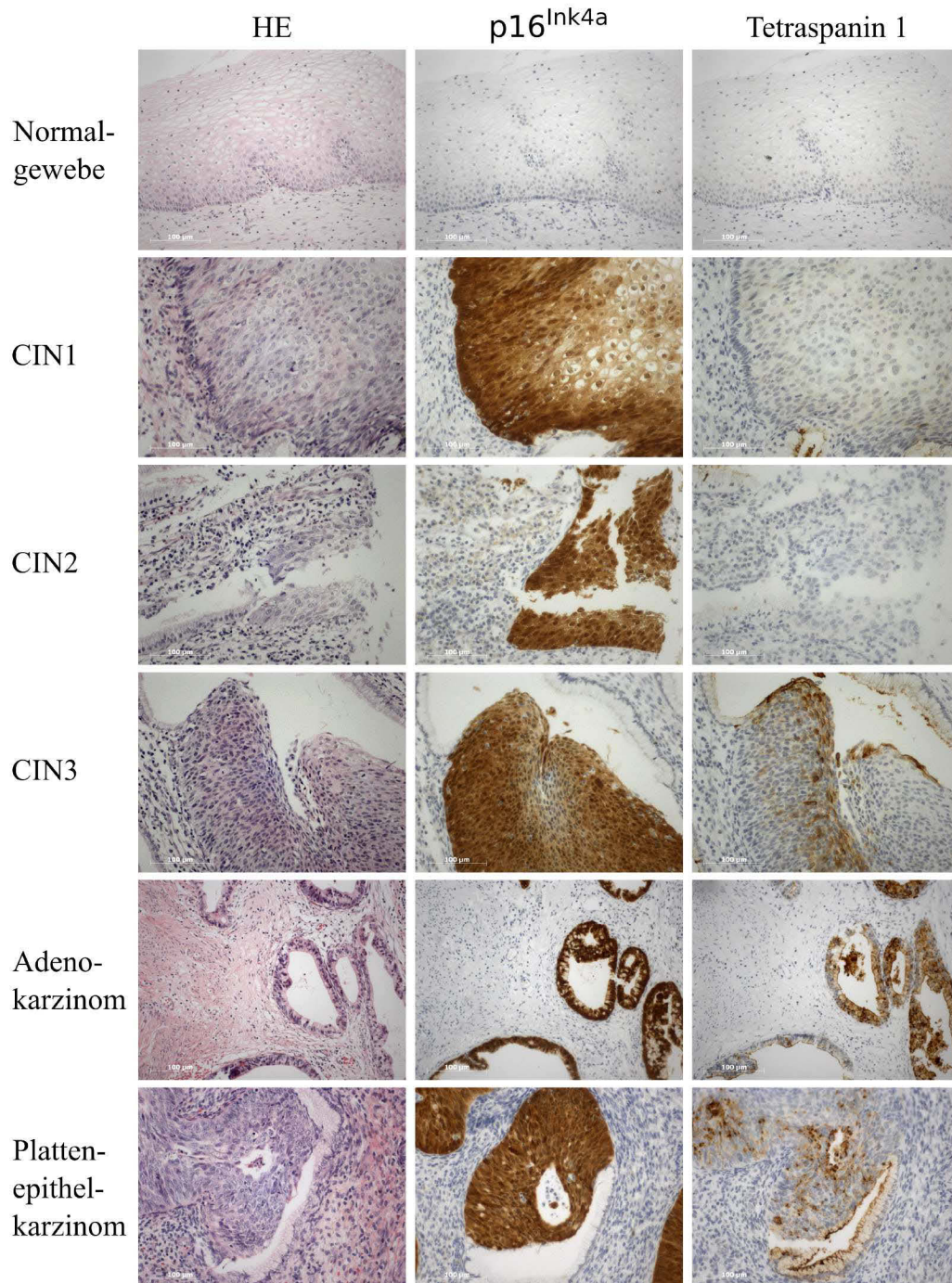


Abbildung 14: **Tetraspanin 1 wird CIN3 und Karzinomen exprimiert.** Die gezeigten Gewebe von zervikalem Normalgewebe, den präkanzerösen Voststufen CIN1 bis CIN3 sowie Adeno- und Plattenepithelkarzinomen wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt sowie das, infolge einer HPV-Infektion überexprimierte, p16^{INK4a} und Tetraspanin 1 immunhistochemisch visualisiert. Die HE-Färbung zeigt eine Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses hin zum Zellkern mit Zunahme des Schweregrades der Neoplasie, hin zum Karzinom. Die Areale der Neoplasien und des Tumorgewebes sind einheitlich positiv für p16^{INK4a}. Für die Tetraspanin 1 Expression zeigt sich keine Expression in Normalgewebe und CIN1 sowie CIN2, jedoch ein inhomogenes Expressionsmuster in CIN3 und im Adeno- sowie Plattenepithelkarzinom. Dabei scheint Tetraspanin 1 in Zellen der Wachstumsfront neoplastischer Areale exprimiert zu werden.

4.1.6, Seite 37), wurde das Tetraspanin 1 Gen in die Zellen eingebracht. Da eine hohe Transfektionseffizienz erzielt werden sollte wurde zunächst der adenovirale Gentransfer gewählt. Bei der Zelllinie SiHa ergab sich eine Transfektionseffizienz von circa 100% (Daten nicht gezeigt). Die Zelllinie HeLa konnte jedoch nicht erfolgreich durch Adenoviren infiziert werden, auf Grund dessen wurde mittels einer Standardmethode transfiziert, mit der eine Transfektionseffizienz von circa 80% erreicht wurde (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde das Invasionsverhalten durch Matrigel überprüft. Sowohl Tetraspanin 1 exprimierende HeLa (Daten nicht gezeigt) als auch SiHa (Abbildung 15, Seite 62) zeigten eine erhöhte Invasivität durch Matrigel im Vergleich zu den Leervektor transfizierten Zellen (bei HeLa) beziehungsweise nicht transduzierten Ausgangszellen ($p=0,006$, Mann-Whitney-Test) und eGFP exprimierenden Zellen ($p=0,067$, Mann-Whitney-Test) (bei SiHa). Tetraspanin 1 ist in der Lage das invasive Potential der Zervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa zu erhöhen, was auf eine positive Beteiligung an den Mechanismen der Zellbeweglichkeit durch Tetraspanin 1 in Zervixkarzinomzellen hindeutet.

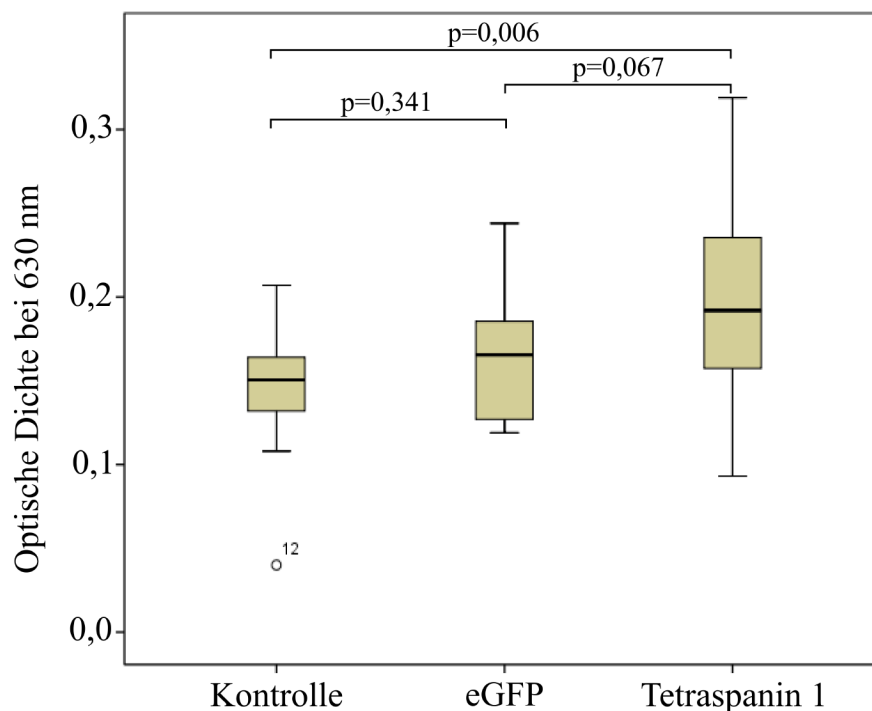


Abbildung 15: Tetraspanin 1 verstärkt die Invasivität der Zervixkarzinomzelllinie SiHa durch Matrigel. Dargestellt sind 4 voneinander unabhängige Experimente mit jeweils vier-fach Bestimmung ($n=16$). Das Tetraspanin 1 sowie eGFP Gen wurde jeweils durch adenoviralen Gentransfer in SiHa Zellen eingebracht (Tetraspanin 1, eGFP), als Kontrolle diente neben den eGFP exprimierenden SiHa die unbehandelten Ausgangszellen (Kontrolle). Tetraspanin 1 exprimierende SiHa zeigten eine Erhöhung der Invasivität im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,006$, Mann-Whitney-Test) sowie zu eGFP exprimierenden SiHa ($p=0,067$, Mann-Whitney-Test).

5.2.3 Die Zell-Matrix-Interaktion von Zervixkarzinomzellen wird nicht durch Tetraspanin 1 beeinflusst

Damit sich Zellen fortbewegen können, was eine Voraussetzung bei der Zellinvasion ist, müssen sie die Kontakte zur extrazellulären Matrix lösen und an anderer Stelle neu knüpfen können. Um festzustellen ob Tetraspanin 1 durch Regulation des Adhäsionsverhaltens die gesteigerte Invasivität der Zelllinie SiHa beeinflusst, wurde die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix Komponenten Fibronectin, Laminin sowie die Kollagen Typen I und III, in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression, untersucht (siehe Kapitel 4.1.10, Seite 40).

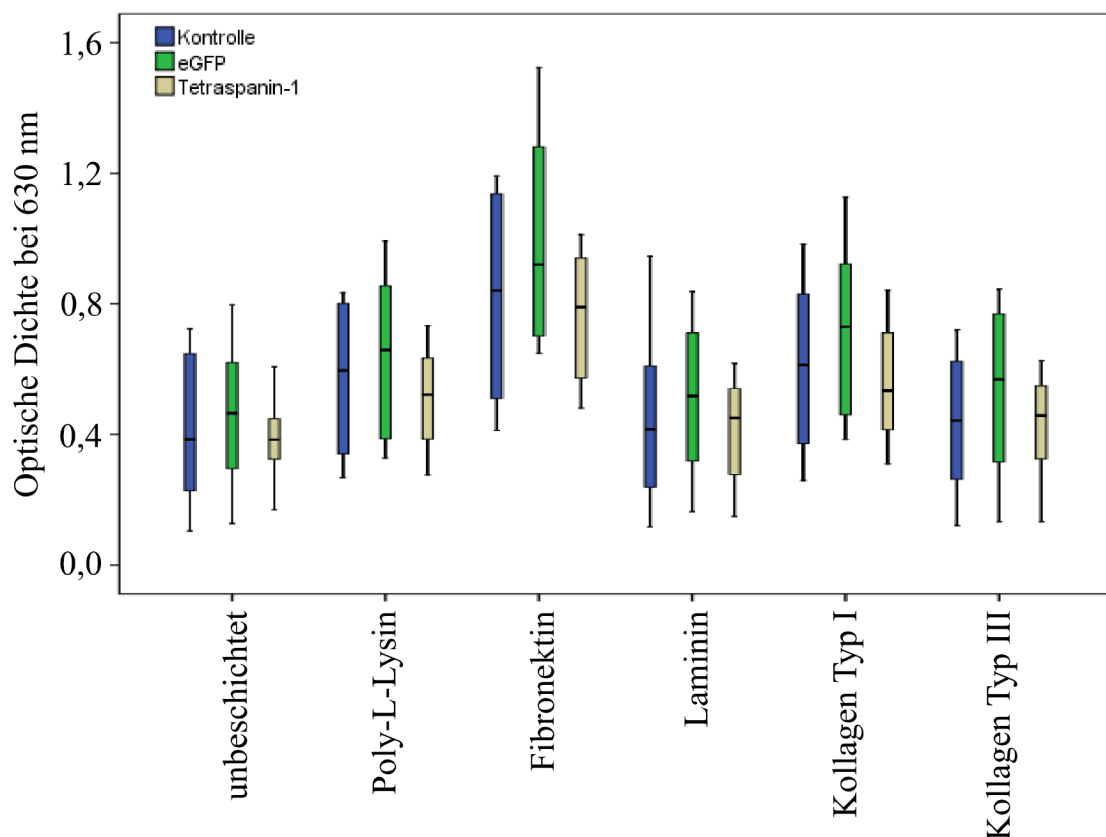


Abbildung 16: **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die Adhäsion an Proteine der Extrazellulären Matrix.** Um mögliche Tetraspanin 1 abhängige Veränderungen im Adhäsionsverhalten zu untersuchen, wurde die Fähigkeit zur Bindung an die extrazellulären Matrix Bestandteile Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III überprüft. Dargestellt sind 4 voneinander unabhängige Experimente mit vier-fach Bestimmung (n=16) für die Ausgangszellen (Kontrolle), eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierende SiHa (Tetraspanin 1). Es wurde keine signifikant veränderte Adhäsion in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt.

Während die Zellen an Laminin und Kollagen Typ III im gleichen Maß wie an die unbeschichtete Zellkulturschale adherierten, war die Adhäsion bei Kollagen Typ I erhöht und auf dem Niveau der Positivkontrolle Poly-L-Lysin. Die stärkste Adhäsion war bei

Fibronectin erkennbar (Abbildung 16, Seite 63). Es konnte keine Tetraspanin 1 abhängige Veränderung im Adhäsionsverhalten der Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin das Tetraspanin 1 nicht an der Kontrolle der Adhäsion an Bestandteile der Extrazellulären Matrix beteiligt ist und die Erhöhung der Invasivität, der Zervixkarzinomzellen durch Tetraspanin 1, nicht auf veränderte Zell-Matrix-Interaktion zurückzuführen ist.

5.2.4 Tetraspanin 1 hat keinen Einfluss auf die Integrin-vermittelte Signaltransduktion

Tetraspanin 1 erhöht die Invasivität der Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Hela (siehe Kapitel 5.2.2, Seite 60) und wird in Gewebearealen von schwer-gradigen Dysplasien und Tumoren verstärkt exprimiert, die Wachstumsfronten darstellen (siehe Kapitel 5.2.1, Seite 60). Die Erhöhung der Invasivität ist jedoch nicht auf eine veränderte Zell-Matrix-Interaktion zurückzuführen (siehe Kapitel 5.2.3, Seite 63). Die Zellbeweglichkeit wird unter anderem durch die Integrin „outside-in“ Signalweiterleitung über die *focal adhesion kinase* (FAK) gesteuert. Nach Integrin Stimulation autophosphoryliert die *focal adhesion kinase* am Tyrosin 397, sowie Paxillin, welches als Adapterprotein für weitere Signalproteine dient. Nach der Autophosphorylierung von FAK bindet die Kinase Src (Akronym für *sarcoma*) an das phosphorylierte Tyrosin 397 und phosphoryliert wiederum die Tyrosine 576/577 und 925 der *focal adhesion kinase*. Über Src wird im weiteren Verlauf der Signalweiterleitung die Aktivierung der *Ras homolog gene family* (Rho) Familie GTPasen sowie die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) aktiviert, welche auch direkt durch FAK aktiviert werden kann. Über das phosphorylierte Tyrosin 925 der *focal adhesion kinase* wird der Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Weg aktiviert. Diese Signalwege nehmen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen durch Remodelierung des Zytoskeletts, sowie auf die Zellproliferation (siehe Kapitel 1.6.2, Seite 18). Es sollte näher untersucht werden ob Tetraspanin 1 Einfluss auf diese Signalwege nimmt. Dazu wurde die Signalweiterleitung nach Stimulation mit Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression untersucht (siehe Kapitel 4.1.11, Seite 40). Dabei wurde die Phosphorylierung der Tyrosine 397, 576/577 sowie 925 der *focal adhesion kinase* untersucht, sowie die Phosphorylierung von Paxillin und der Protein Kinase B (Akt/PKB) als stromabwärts der PI3-Kinase liegendes Signalmolekül.

Die *focal adhesion kinase* wurde durch Fibronectin sowie Kollagen Typ I und III an allen untersuchten Tyrosinresten verstärkt phosphoryliert. Die Phosphorylierung durch Laminin lag auf dem selben Niveau wie die Negativkontrollen, Poly-L-Lysin und unbeschichteten Zellkulturschalen. Die Ergebnisse der drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente waren inkonsistent. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in der Phosphorylierung, in Abhängigkeit von Tetraspanin 1, nicht vorhanden waren. Des weiteren wurden auch keine Unterschiede in der Phosphorylierung

von Paxillin und Akt/PKB in Abhängigkeit der Stimulation und Tetraspanin 1 festgestellt (Abbildung 17, Seite 65).

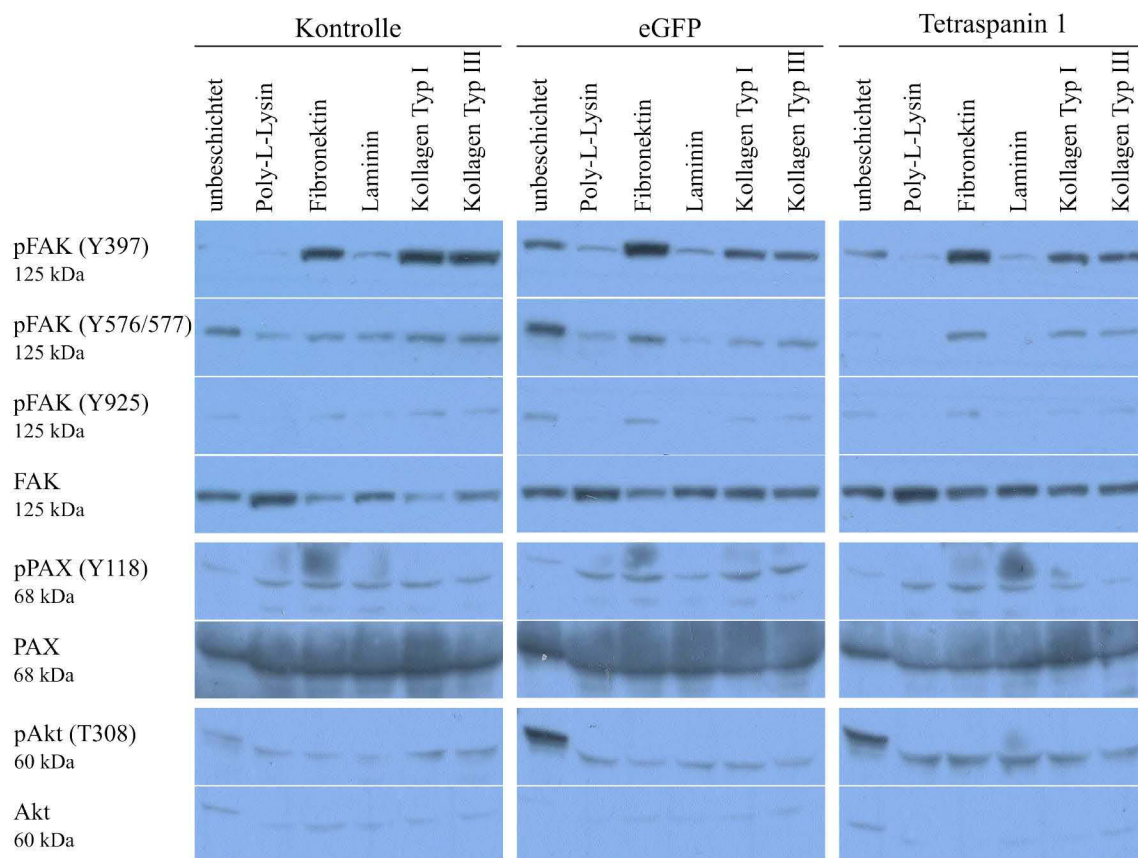


Abbildung 17: Tetraspanin 1 ist nicht an der Integrin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Um die Steuerung der erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinom Zellen auf Signaltransduktions-Ebenen zu untersuchen, wurde die Integrin-vermittelte Signalweiterleitung nach Kontakt zu den extrazelluläre Matrix Komponenten Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III untersucht. Durch Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* wurden die zentralen Signalproteine *focal adhesion kinase* (FAK), Paxillin und Akt sowie ihre phosphorylierten Formen nachgewiesen. Dargestellt ist ein exemplarisches, von drei voneinander unabhängigen, Experimenten, deren Ergebnisse inkonsistent waren. Dies deutet darauf hin das für keines der untersuchten Signalproteine Unterschiede in der Phosphorylierung, in Abhängigkeit von Tetraspanin 1, vorhanden sind.

Aufgrund der unveränderten Aktivierung der *focal adhesion kinase*, Paxillin sowie Akt/PKB lässt sich eine Regulation der gesteigerten Invasivität durch Tetraspanin 1 über diese Signalproteine ausschließen. Weiterhin ist kein Tetraspanin 1 abhängiger Unterschied in der Phosphorylierung des Tyrosin 925 der *focal adhesion kinase* erkennbar, was die Vermutung zulässt das Tetraspanin 1, über den Integrin-aktivierten MAP-Kinase Signalweg, keine Veränderung der Zellproliferation auslöst.

5.2.5 Tetraspanin 1 reduziert potentiell die Expression der Matrix Metalloproteinase 14

Für die Invasion von Zellen in tiefer liegende Gewebeschichten, werden von den betreffenden Zellen Matrix Metalloproteinasen (MMPs) exprimiert, welche den extrazellulären Raum entsprechend umgestalten und dadurch Invasion ermöglichen. Um zu untersuchen ob die beobachtete Steigerung der Invasivität, in Abhängigkeit der Expression von Tetraspanin 1, einhergeht mit einem veränderten Profil der Matrix Metalloproteinase Expression, wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Universität Würzburg die Expression aller 23 bekannten humanen MMPs untersucht (siehe Kapitel 4.4, Seite 49). Während, in einem initialen Experiment, für die Zelllinie HeLa keine Unterschiede hinsichtlich der mRNA bei den exprimierten MMPs festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt) zeigte sich bei SiHa eine verminderte Expression der membranständigen Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14, MT1-MMP) bei Tetraspanin 1 exprimierenden Zellen im Vergleich zu eGFP exprimierenden und den Ausgangszellen (Daten nicht gezeigt).

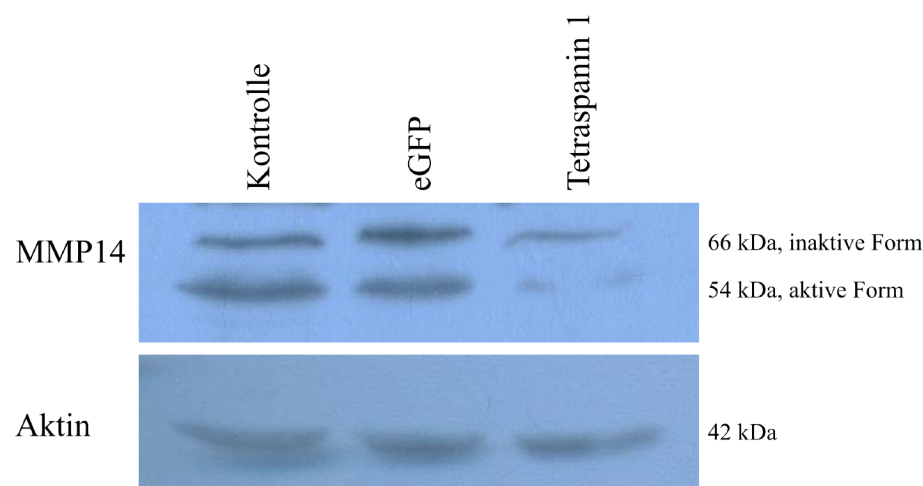


Abbildung 18: **Tetraspanin 1 vermindert potentiell die Expression der Matrix Metalloproteinase 14, in der Zervix Karzinom Zelllinie SiHa.** Im Vergleich zu den Ausgangszellen (Kontrolle) und eGFP exprimierenden SiHa (eGFP) konnte eine verminderte MMP14 Protein Expression, sowohl der inaktiven als auch der aktiven Form, in Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa (Tetraspanin 1) festgestellt werden. Dargestellt ist eins von 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

Um die verminderte MMP14 Expression auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurde mittels Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* die Protein Expression überprüft (siehe Kapitel 4.4, Seite 49). Während für die Zelllinie HeLa ebenfalls keine Unterschiede feststellbar waren (Daten nicht gezeigt), konnte die verminderte MMP14 Expression bei SiHa in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression auch auf Protein Ebene, in 2 Versuchen, gezeigt werden. Die Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa zeigen eine verminderte

MMP14 Expression der inaktiven, 66 kDa großen, sowie der aktiven, 54 kDa großen, Form im Vergleich zu den Ausgangszellen und den eGFP exprimierenden SiHa (Abbildung 18, Seite 66).

Um die Expression von MMP14 an Gewebematerial von schwer-gradigen Neoplasien und Zervixkarzinomen zu untersuchen, wurden ebenfalls Gewebearrays immunhistochemisch untersucht. Hierbei zeigte sich keine Korrelation zwischen Tetraspanin 1 exprimierenden Tumorarealen und der Expression von MMP14, wie in der Zelllinie SiHa. Die Expression von MMP14 war in allem Tumorarealen homogen, während Tetraspanin 1 das typische inhomogene Expressionsmuster aufwies (Daten nicht gezeigt). Ob Tetraspanin 1 tatsächlich die Expression von MMP14 negativ beeinflusst konnte aufgrund der geringen Anzahl der Experimente und der immunhistochemischen Daten nicht sicher bestätigt werden. Der verwendete Antikörper zum Nachweis von MMP14 zeigte unspezifische Bindungen bei der Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot*. Aufgrund dessen sind die Immunhistochemie Daten möglicherweise nicht aussagekräftig da unspezifische Signale nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnten. Sollte, in Anwesenheit von Tetraspanin 1, die Expression von MMP14 vermindert werden, steht dies im Widerspruch zu der erhöhten Invasivität der Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa Zellen. In weiteren Versuchen sollte der Einfluss von Tetraspanin 1 auf die Expression von MMP14 genauer bestätigt werden.

5.2.6 Die *in vitro* Zellproliferation von Zervixkarzinomzellen bleibt unbeeinträchtigt durch Tetraspanin 1

Tumorzellen zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, unkontrolliert zu wachsen (proliferieren) und sich zu teilen. Um den Einfluss von Tetraspanin 1 auf die Proliferation der Zervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa zu untersuchen wurde zunächst die Zellproliferation über 72 Stunden untersucht (siehe Kapitel 4.1.8, Seite 38). Dabei wurden weder bei HeLa noch bei SiHa Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen Tetraspanin 1 exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Zur Sicherung dieses Ergebnisses wurden SiHa Zellen, in vier voneinander unabhängigen Experimenten, über sechs Stunden näher untersucht, mit dem selben Ergebnis, dass Tetraspanin 1 keinen Einfluss auf die Proliferation adhärent wachsender Zellen zu haben scheint. Nach sechs Stunden waren keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den nicht transduzierten Ausgangszellen, den eGFP exprimierenden sowie den Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa erkennbar (Abbildung 19, Seite 68).

Tetraspanin 1 verstärkt weder die Adhäsion der Zelllinie SiHa an Proteine der Extrazellulären Matrix, noch vermindert es sie (siehe Kapitel 5.2.3, Seite 63). Um zu untersuchen ob Tetraspanin 1 das Zellwachstum unabhängig der Zell-Matrix-Kontakte beeinflusst wurden Kolonie Formations Assays durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.9, Seite 39). Auch bei der Kontakt-unabhängigen Proliferation wurden keine Unterschiede zwischen Tetraspanin 1

exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen festgestellt. Für die Ausgangszellen bildeten sich in 9 von 12 Versuchsansätzen Kolonien, für eGFP exprimierende SiHa 6 von 12 und für Tetraspanin 1 exprimierende SiHa 8 von 12. Dabei wurden keine Unterschiede in Anzahl und Größe der gebildeten Kolonien zwischen den jeweiligen Ansätzen festgestellt (Abbildung 20, Seite 69). Diese Ergebnisse zeigen das Tetraspanin 1, funktionell, weder die Proliferation der adhärent wachsenden Zervixkarzinomzelllinien HeLa und SiHa beeinflusst, noch das Zell-Matrix-Kontakt-unabhängige Wachstum der Zelllinie SiHa.

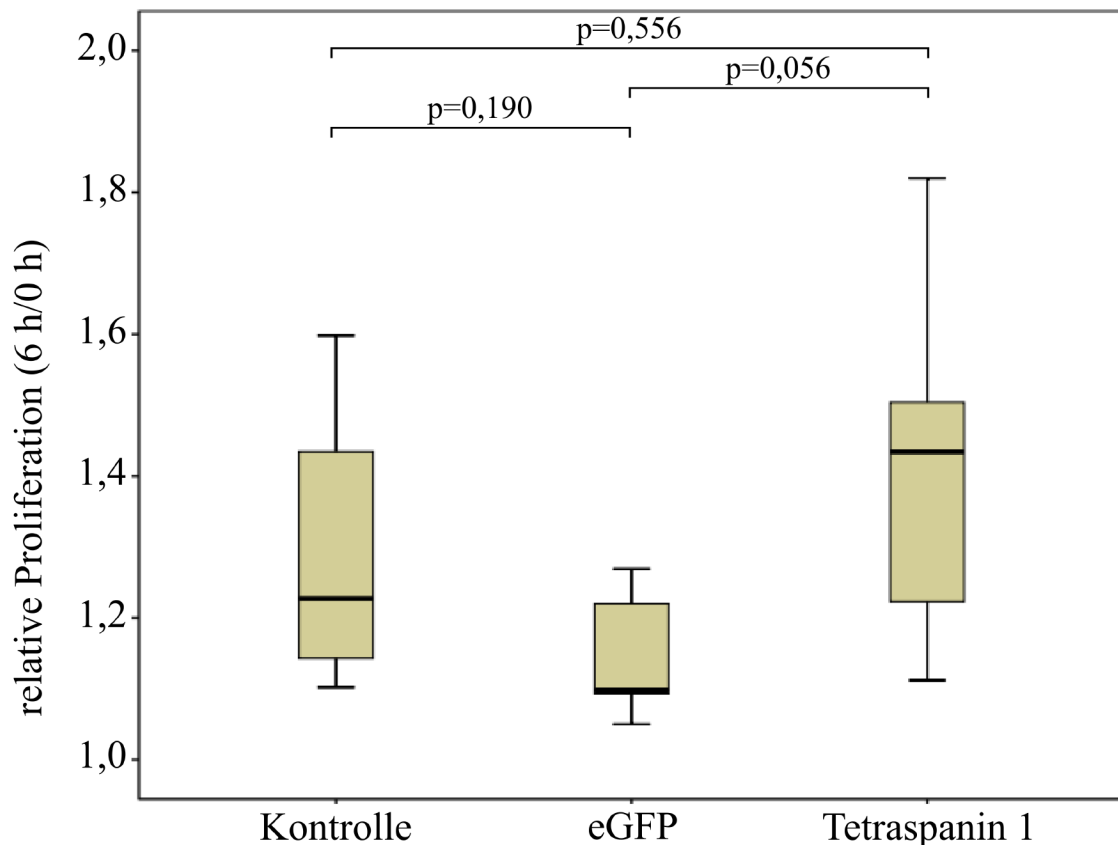


Abbildung 19: **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die adhäsive, *in-vitro* Zellproliferation.** Zur genaueren Untersuchung ob Tetraspanin 1 die Proliferation der Zervixkarzinomzelllinie SiHa beeinflusst wurde nach sechs Stunden mittels MTT-Umsatz indirekt die Proliferation der Zellen bestimmt. Dargestellt sind die normalisierten Daten aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung (n=4) für die Ausgangszellen (Kontrolle) und fünf voneinander unabhängige Experimente mit drei-fach- und Doppelbestimmung (n=5) für eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierende SiHa (Tetraspanin 1). Es wurde keine signifikant (Mann-Whitney-Test) veränderte Proliferation in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt.

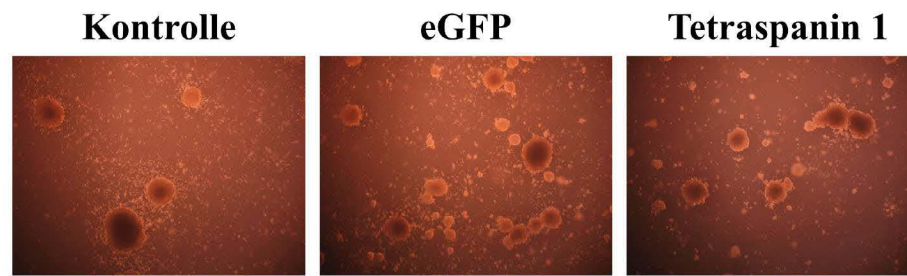


Abbildung 20: **Tetraspanin 1 hat keinen Effekt auf die Kontakt-unabhängige, *in-vitro* Zellproliferation.** Um zu untersuchen ob Tetraspanin 1 die Kontakt-unabhängige Zellproliferation beeinflusst, wurden Kolonie Formations Assays durchgeführt, bei denen die Zellen nicht-adhären in einer Agaroseschicht wachsen. Dargestellt ist ein repräsentatives von 4 voneinander unabhängigen Experimenten mit drei-fach Bestimmung (n=12). Kolonien bildeten sich in 9 von 12 Fällen für die Ausgangszellen (Kontrolle), 6 von 12 bei eGFP exprimierende SiHa (eGFP) und 8 von 12 bei Tetraspanin 1 exprimierenden SiHa (Tetraspanin 1), dabei wurden weder Unterschiede in Größe noch in der Anzahl der Kolonien zwischen den drei Gruppen festgestellt.

5.2.7 Tetraspanin 1 hat keinen Einfluss auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion

Der funktionelle Einfluss von Tetraspanin 1 auf die Zellproliferation, sowohl bei adhären-tem als auch Kontakt-unabhängigem Zellwachstum, konnte für die Zervixkarzinomzelllinie SiHa ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 5.2.6, Seite 67). Um diese Beobachtungen auf Ebene der Signaltransduktion zu bestätigen, wurde die Zellproliferation regulierende Signalweiterleitung untersucht. Dazu wurde die Aktivierung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Weges über Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) über den EGF-Rezeptor näher untersucht (siehe Kapitel 1.6.1, Seite 16). Mittels Stimulation durch EGF sollte die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors, die Aktivierung der GTPase *Rat sarcoma* (Ras) sowie der im MAP-Kinase Signalweg stromabwärts liegenden MAP-Kinase Erk1/2 untersucht werden.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde hierbei auf die Untersuchung der Ausgangszellen (SiHa) verzichtet. Auch hierbei zeigten sich zwischen den unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten inkonsistente Ergebnisse hinsichtlich der Bandenintensitäten, weswegen folgende Schlussfolgerungen gezogen wurden.

Weder für die Phosphorylierung (Aktivierung), noch die Internalisierung (Deaktivierung), des EGF-Rezeptors konnten Unterschiede in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt werden. Für die Aktivierung, den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP), von Ras konnten ebenfalls keine Unterschiede in der GTP-gebunden Form nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Hinsichtlich dieser Ergebnisse zeigte die Phosphorylierung der Kinasen Erk1/2, erwartungsgemäß, ebenfalls keine Unterschiede in Abhängigkeit der Expression von Tetraspanin 1 in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa (Abbildung 21 A, Seite 70) sowie HeLa (Abbildung 21 B, Seite 70).

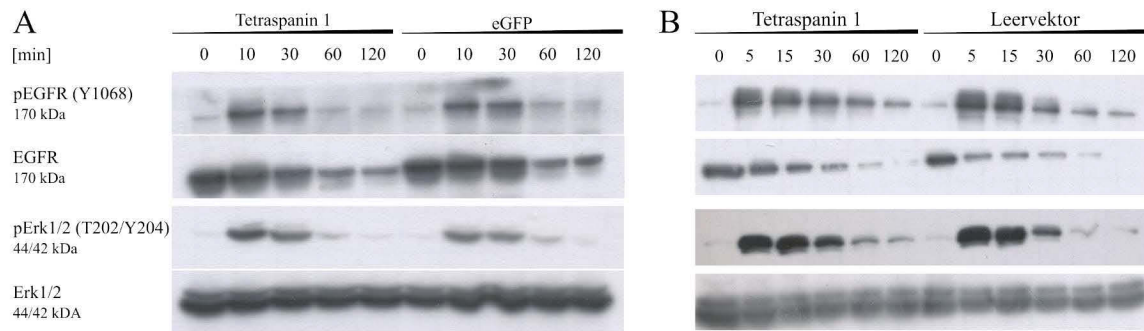


Abbildung 21: Tetraspanin 1 ist nicht an der EGF-vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Um die Ursache der erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinomzellen auf Signaltransduktions-Ebene zu untersuchen, wurde die Signalweiterleitung nach Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) untersucht. Durch Immundetektion nach SDS-PAGE und *Western Blot* wurden der EGF-Rezeptor und Erk1/2 sowie ihre phosphorylierten Formen nachgewiesen. A) SiHa, dargestellt ist ein exemplarisches, von 4 voneinander unabhängigen, Experimenten. Für keines der untersuchten Signalproteine konnten Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen eGFP exprimierenden (eGFP) und Tetraspanin 1 exprimierenden Zellen (Tetraspanin 1) im Verlauf der Stimulation festgestellt werden. B) HeLa, dargestellt ist ein exemplarisches von 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Für keines der untersuchten Signalproteine konnten Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen der Leervektor transfizierten Kontrolle (Leervektor) und Tetraspanin 1 exprimierenden Zellen (Tetraspanin 1) im Verlauf der Stimulation festgestellt werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen im Proliferationsverhalten beider Zelllinien überein und bestätigt das Tetraspanin 1 keine Einfluss auf die Zellproliferation der untersuchten Zervixkarzinomzelllinien hat.

6 Diskussion

6.1 Entwicklung eines *Sandwich*-ELISA zum Nachweis des HPV45 Onkogen E7

Eine Voraussetzung für die Entwicklung des Zervixkarzinoms ist die Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV). Die HPV-Prävalenz beim Zervixkarzinom beträgt 99,7% [177]. Aus diesem Grund wird bei der Vorsorgeuntersuchung neben der zytologischen Bewertung ebenfalls auf das Vorhandensein von *high risk* HPV-DNA geprüft [37], was zu einer Verbesserung der Früherkennung schwer-gradiger zervikaler Neoplasien (CIN) 2 und 3 führt [108, 19]. Die zytologische Untersuchung beruht auf der visuellen Beurteilung morphologischer Veränderungen der entnommenen Zellen, wodurch die Beurteilung sehr subjektiv ausfallen kann. Was die Erkennung schwer-gradiger Neoplasien (CIN2 und höher) betrifft, weist die zytologische Untersuchung eine Sensitivität von 53%, eine Spezifität von 96,3% und einen positiven Vorhersagewert von 20,3% auf [38]. Aufgrund der hohen HPV-Prävalenz im Zervixkarzinom sollte der Nachweis der HPV-DNA die Erkennung schwer-gradiger Neoplasien verbessern. Die Sensitivität beim HPV-DNA Nachweis liegt bei 96,1%, was eine deutlicher Verbesserung der Erkennung schwer-gradiger Neoplasien im Vergleich zur Zytologie bedeutet. Die Spezifität ist jedoch geringer und beträgt 90,7%, woraus eine höhere falsch-positiv-Rate im Vergleich zur Zytologie resultiert. Der positive Vorhersagewert beträgt 15,5% [38]. Der geringe positive Vorhersagewert beider Methoden bedeutet das nur 15-20% der zytologisch auffälligen oder HPV-positiven Zellabstriche auch tatsächlich auf eine CIN2 und höher zurückzuführen sind. Die Erkennung der tatsächlichen Fälle ist durch beide Methoden nicht sehr hoch. Aus diesem Grund ist es nötig Diagnostikverfahren zu entwickeln, die ergänzend, oder anstelle, zum HPV-DNA Nachweis und zur Zytologie, in der Diagnostik eingesetzt werden können und den positiven Vorhersagewert erhöhen.

Beteiligt an der malignen Transformation der infizierten Epithelzellen der Zervix sind die beiden frühen HPV-Genprodukte E6 und E7, welche beide unabhängig voneinander, verstärkt jedoch in Kombination, die Transformationseffizienz steigern [119, 104, 57, 55]. Als molekularer Marker könnte neben der HPV-DNA auch HPV-mRNA dieser beiden Onkogene dienen, da deren Genexpression in allen Neoplasien nachweisbar ist, nicht aber in latent infizierten Zellen. In ersten Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass der Nachweis von E6/E7 mRNA die Identifizierung tatsächlich vorliegender schwer-gradiger Neoplasien weiter verbessert [4, 163].

Wir postulieren, dass durch den Nachweis der Onkoproteine selbst eine weitere Steigerung der Spezifität, und somit des positiven Vorhersagewertes, möglich sein sollte. Darüber hinaus könnten auch andere, mit der Zervixkarzinogenese assoziierte, zelluläre Proteine als molekularer Marker dienen.

Da das virale Onkoprotein E7 an der Transformation der HPV-infizierten Epithelzel-

le einen großen Anteil hat (siehe Kapitel 1.3, Seite 5), liegt die Vermutung nahe, dass bei Vorhandensein des E7 Proteins auch eine schwer-gradigen Neoplasie vorliegt. Zur Entwicklung eines Testsystems zum Nachweis des HPV45 E7 Onkoproteins, wurden zunächst monoklonale Antikörper generiert. Von den sieben Antikörper Klonen waren drei HPV45 spezifisch und vier zeigten eine Kreuzreaktivität zu HPV18 E7 (siehe Tabelle 8, Seite 52). Die aufgereinigten Antikörper wurden zunächst auf Funktionalität in histo- und zytologischen Methoden getestet. Keiner der generierten Antikörper Klone war in der Immunhistochemie einsetzbar, jedoch waren sie bei der Immunzytochemie verwendbar (siehe Tabelle 7, Seite 52). Mit Hilfe der generierten Antikörperer könnte der Nachweis von HPV45 E7 (beziehungsweise HPV18 E7, infolge der Kreuzreaktivität bestimmter Klone) eine Ergänzung zu bereits verwendeten Markerproteinen in der Zytologie darstellen. Zum Beispiel korreliert die Ki-67 Expression, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird, mit dem Grad zervikaler Neoplasien [1, 135, 51]. Der Nachweis von Ki-67 als Tumormarker findet weiterhin Anwendung bei anderen Karzinomen, zum Beispiel beim Endometriumkarzinom [85] oder in Neoplasien des Speiseröhren-Plattenepithels [179]. Ein weiteres Protein was eng mit dem Grad der zervikalen Neoplasien einhergeht ist der Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A, p16^{Ink4a}), welcher an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Aufgrund der E7 verursachten Inaktivierung von pRB, kommt es zu einer Überexpression von p16Ink4a [79, 78, 173, 103]. Verschiedene Untersuchungen zeigten das Ki-67 und p16^{Ink4a}, in Kombination miteinander, für die Erkennung schwer-gradiger Neoplasien einsetzbar sind und eine Verbesserung der Zervixkarzinomvorsorge darstellen [190, 118, 8]. Während erste Versuche zum Nachweis von HPV 16, 18 und 45 E7 mit polyklonalen Antikörpern in Gewebematerial von Zervixkarzinomen gelungen sind [125] konnte lediglich nur für HPV16 E7 der Nachweis mittels eines monoklonalen Antikörpers an Zervixabstrichen gezeigt werden [70].

Neben dem Nachweis von HPV45 E7 mittels der generierten monoklonalen Antikörper in Zellen, wurde ein *Sandwich*-ELISA zum E7 Nachweis aus Zelllysaten entwickelt. Dazu wurden zunächst die beiden verwendeten Antikörper Klone, durch Biotinylierung und Konjugation mit Meerettich Peroxidase, modifiziert. Der entwickelte *Sandwich*-ELISA war in der Lage HPV45 E7 sowohl aus Lysaten von Zelllinien (siehe Abbildung 11, Seite 54 und Abbildung 12, Seite 55) sowie Lysaten aus Tumorgewebe nachzuweisen (siehe Abbildung 13, Seite 56). Um die Anwendbarkeit des entwickelten *Sandwich*-ELISA für den HPV45 E7 Nachweis in Zelllysaten aus Abstrichmaterial zu untersuchen, wurden 223 Patientenproben gesammelt und untersucht. Es erfolgte eine Bestimmung des HPV-Typs und eine zyto- beziehungsweise histologische Bewertung der, bei entsprechender Indikation, entnommenen Biopsien, im Rahmen der Routinediagnostik (siehe Tabelle 9, Seite 57 und Tabelle 10, Seite 58). Unter den gesammelten Proben waren sieben HPV45-DNA positive, wovon fünf histologisch unauffällig waren und jeweils eine einer CIN1 sowie CIN1-2 entsprach (siehe Tabelle 11, Seite 58). Mit dem *Sandwich*-ELISA wurden eine der sieben HPV45 positiven Proben und fünf HPV-negative sowie zwei Proben anderen

high risk HPV-Typen detektiert (siehe Tabelle 12, Seite 59). Daraus ergab sich hinsichtlich der HPV-Typisierung als Referenz Methode eine Sensitivität von 14,3% und eine Spezifität von 96,8%. Von den beiden leicht-gradigen, HPV45 positiven CIN konnte eine auch als solche erkannt werden (siehe Tabelle 13, Seite 59). Gegenüber dem Nachweis histologisch bestätigter CIN ergab der entwickelte *Sandwich*-ELISA eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 100%. Das entwickelte Nachweissystem detektierte keine der histologisch unauffälligen, HPV45 positiven, und nur 7 (3,2%) der HPV45-negativen Proben. Die Erkennung von falsch-positiven Patientinnen ist damit sehr gering. Was die Erkennung von Neoplasien angeht, wovon eine von zwei erkannt wurde, muss der *Sandwich*-ELISA in einer Studie mit einer höheren Fallzahl HPV45 positiver CINs und Zervixkarzinomen, die bei der Krebsvorsorge detektiert werden müssen, noch validiert werden.

Ein direkter Nachweis des E7 Onkoproteins der HPV Typen 16 und 18, wurde ebenfalls mittels ELISA aus Lysaten aus Zellabstrichen erbracht, jedoch nur anhand einer geringen Fallzahl. Dabei konnten aus 13 Lysaten von zervikalen Zellabstrichen, in fünf Lysaten HPV16 E7 detektiert werden [149]. Ein *Sandwich*-ELISA für den Nachweis von HPV18E7 wurde vor kurzem etabliert. Gemäß der Messwerte von Lysaten aus 24 HPV-negativen Zellabstrichen wurde ein Grenzwert festgelegt und 14 HPV18 positive Lysate untersucht. Aus diesen 14 Proben, welche zytologisch jedoch nur teilweise auch histologisch beurteilt wurden, konnte in sieben HPV18 E7 nachgewiesen werden. Darunter waren zwei als Pap II, zwei von sieben als Pap III, zwei Pap IV und eine als Pap V eingestuft [46]. Wobei nur Pap IV und Pap V auf das Vorliegen einer CIN2, CIN3 oder eines Zervixkarzinoms hindeuten. Untersuchungen hinsichtlich des Potentials des viralen Onkoproteins E6 als molekularen Marker, ergaben eine zunehmende Expression mit steigendem Schweregrad der Neoplasie. Mittels *Western Blot* Analyse wurden Proben 12 unauffälliger, acht CIN1, 11 CIN2 und sieben CIN3 Patientinnen untersucht. Dabei wurde in 0% (unauffällig), 12,5% (CIN1), 36,4% (CIN2) und 42,9% (CIN3) der jeweiligen Proben das E6 Protein detektiert [148]. Weiterhin wurden für den Nachweis von p16^{Ink4a} neben einer zytologischen Methode zur Detektion in Zellen, auch ein ELISA zur Detektion des Proteins in Zelllysaten entwickelt und angewandt [95]. Dieser Test erreichte eine Sensitivität von 50,9% und eine Spezifität von 90,4% zur Erkennung von CIN3 [7].

Der Nachweis von spezifischen, mit der Zervixkarzinogenese einhergehenden, viralen und zellulären Proteinen kann die diagnostischen Verfahren zur Früherkennung verbessern. Der mit den generierten monoklonalen Antikörpern gegen HPV45 E7 entwickelte *Sandwich*-ELISA ist in der Lage das E7 Protein aus Lysaten von Zellen und Gewebematerial zu binden und zu detektieren. Wenngleich eine Validierung mit einer höheren Anzahl an HPV45 positiven klinischen Proben mit schwer-gradiger Neoplasie zur Bestimmung der Sensitivität und des positiven Vorhersagewertes erfolgen muss, könnte er eine Ergänzung der bisherigen diagnostischen Methoden darstellen. Darüber hinaus sind die generierten monoklonalen Antikörper in der Lage neben von HPV45 E7 ebenfalls

HPV18 E7 in Zellen nachzuweisen und bieten sich somit zur zusätzlichen Anwendung in der zytologischen Begutachtung an. Die im Rahmen dieses Teilbereichs der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass das virale Onkoprotein E7 als molekularer Marker für die Zervixkarzinomvorsorge geeignet ist und die generierten monoklonalen Antikörper und speziell der entwickelte *Sandwich*-ELISA bieten Möglichkeiten zur diagnostischen Nutzung zum Nachweis von HPV45 E7.

6.2 Die Rolle von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom

Die Transmembran 4 Superfamilie (TM4SF) umfasst derzeit 33 Mitglieder beim Menschen [64]. Tetraspanine sind durch ihre große extrazelluläre Domäne sowie ihre intrazellulären Palmitoylierungsstellen in der Lage andere Proteine zu binden [147, 77, 24]. Sie interagieren mit anderen Tetraspaninen und Transmembranproteinen wie zum Beispiel Integrine [130, 11, 131, 15]. Die dadurch ausgebildeten Tetraspanin-reichen Mikrodomänen (*tetraspanin enriched microdomain*, TEM) sind beteiligt an einer Vielzahl von Zellfunktionen und -prozessen, dazu gehören Zellproliferation [116], Zell-Zell-Adhäsion [96], Zellbeweglichkeit [98, 130] sowie Signalweiterleitungsprozesse [115, 141].

Ziel dieses Teilbereichs der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von Tetraspanin 1 im Zervixkarzinom. In früheren Arbeiten des Labors wurde eine zunehmende Expression von Tetraspanin 1 auf RNA-Ebene durch RNA-RNA *in-situ* Hybridisierung [109] und auf Proteinebene durch immunhistochemische Untersuchung von Biopsiematerial von verschiedenen gradigen Neoplasien und Karzinomen gezeigt. Dabei wurde neben einer Expression im Zervixkarzinom selbst, ebenfalls eine Expression in einer Subgruppe schwer-gradiger (CIN3), und eine nur schwache Expression in leicht-gradigen (CIN1 und CIN2) Neoplasien festgestellt [182].

Eigene immunhistochemische Untersuchungen, mit einem monoklonalen Antikörper, ergaben eine inhomogene Expression von Tetraspanin 1 innerhalb des Tumorgewebes, sowie eine starke Expression in Zellen der Wachstumsfront der schwer-gradigen Neoplasien und Karzinome (Abbildung 14, Seite 61). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Beteiligung von Tetraspanin 1 am Invasionsprozess der entsprechenden Zervixkarzinomzellen hin. Das Herauslösen von Karzinomzellen aus dem Primärtumor und ihre Invasion durch die umliegende extrazelluläre Matrix spielt im Prozess der Metastasierung eine bedeutende Rolle. Einflussfaktoren dieser Prozesse bieten möglicherweise einen Ansatzpunkt zur Therapie von Tumorwachstum und Metastasierung, mehr aber einen potentiellen diagnostischen Nutzen. Proteine welche mit einer schlechten Prognose durch aggressiveren Krankheitsverlauf in Verbindung stehen, und dabei bereits in schwer-gradigen Neoplasien exprimiert werden, könnten wichtige Tumormarker darstellen. Um die Vermutung, dass Tetraspanin 1 eine Rolle bei der Invasion des Zervixkarzinoms spielt, näher zu untersuchen, wurden die Zervixkarzinomzelllinien SiHa und HeLa als Zellkulturmodell genutzt. Beide Zelllinien exprimieren kein Tetraspanin 1, durch adenoviralen Gentransfer

wurde Tetraspanin 1 ektopisch in SiHa exprimiert, in HeLa wurde das Gen für Tetraspanin 1 durch Transfektion eingebracht. Zunächst wurde das Invasionsverhalten beider Zelllinien in Abhängigkeit von Tetraspanin 1 in Invasionsversuchen unter Zuhilfenahme von Matrigel durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Zunahme der invadierenden Zellen bei Expression von Tetraspanin 1 im Vergleich zu den Kontrollen bei SiHa (Abbildung 15, Seite 62) und ebenfalls eine erhöhte Invasion bei HeLa (Daten nicht gezeigt). In Verbindung mit den Beobachtungen an Biopsie Material von schwer-gradigen Neoplasien und Zervixkarzinomen (Abbildung 14, Seite 61), deuten diese Ergebnisse auf eine verstärkende Beeinflussung der Invasivität von Zervixkarzinomzellen durch Tetraspanin 1 hin. Andere Studien Tetraspanin 1 betreffend, ergaben ähnliche Effekte wie die hier beobachteten. Eine durch siRNA unterdrückte Protein Expression von Tetraspanin 1 bei der Haut-Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 sowie Kolonkarzinomzelllinie HCT-8 bewirkte in beiden Zelllinien eine Reduktion der Migration und Invasion [29, 30]. Für andere Mitglieder der Tetraspanin Familie wurden ebenfalls Untersuchungen hinsichtlich ihrer Rolle bei Migration und Tumordinvasion durchgeführt. Im Falle des Zervixkarzinoms wurde gezeigt dass das Tetraspanin CD9 in normalem Gewebe der Zervix, jedoch vermindert im Zervixkarzinom exprimiert wird, mit Ausnahme von invasiv wachsenden Bereichen des Tumors, hier zeigte sich eine Re-Expression von CD9 [136]. Invasionsversuche mit Endothelzellen (HUVEC) und ihre Zellschicht durchquerende Melanomzellen (A375), ergaben ein Vorhandensein der Tetraspanine CD9, CD81 und CD151, teilweise in Verbindung mit α_3 Integrin, an den Kontaktstellen der Tumorzellen zu den Endothelzellen. Eine Inkubation der Melanomzellen mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Tetraspanine ergaben eine Reduktion der transendothelialen Migration bei der Blockierung von CD9, jedoch nicht von CD81 oder CD151 [92]. Für CD151 konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa ebenfalls zu einer gesteigerten Migration führte [166]. Weiterhin bewirkte eine erhöhte Expression von CD151 in den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 ebenfalls eine gesteigerte Migration und Invasion [5]. Die Bildung von *in vivo* Metastasen durch die Epidermoidkarzinomzelllinie HEp3 sowie Fibrosarkomzelllinie HT1080 konnten durch spezifische Antikörper gegen CD151 inhibiert werden. Es wurde gezeigt dass CD151 an der Zellmigration, ausgelöst durch Bestandteile der extrazellulären Matrix, beteiligt ist. Die Zellmigration auf Laminin und Collagen Typ I wurde durch vorherige Antikörper Blockierung von CD151 inhibiert, jedoch nicht die Matrixprotein-unabhängige Migration [200]. Tetraspanin 8 (TM4SF3, Co-029), überexprimiert in den Ösophaguskarzinomzelllinien KYSE150 and EC9706, steigert sowohl die Migration, als auch die Invasivität beider Zelllinien. Des Weiteren wird *in vivo* die Metastasierung der Zelllinie EC9706 erhöht [199]. Im Gegensatz zu der positiven Beeinflussung der Invasivität, wurde ebenso ein negativer Effekt in Abhängigkeit des Tetraspanins CD82 gezeigt. Eine Expression von CD82 in den Prostatakarzinomzelllinie PC3 und Du145 sowie der Fibrosarkomzelllinie HT1080, bewirkt eine reduzierte Migration sowie Invasion aller drei Zelllinien [158, 9]. Die gezeigten Bei-

spiele sowie die Ergebnisse dieser Arbeit, hinsichtlich des Invasionsverhaltens, deuten auf eine positive Einflussnahme von Tetraspanin 1 auf die Zellbeweglichkeit von Zervixkarzinomzellen hin.

Für die Migration und Invasion der Zellen muss die Zelle Zell-Matrix-Kontakte lösen und neu eingehen. Wie bereits erwähnt, interagieren Tetraspanine mit den Adhäsions-Rezeptoren der Integrin Superfamilie. Eine Vielzahl von zellulären Prozessen, darunter Proliferation und Zellbeweglichkeit, werden durch Interaktion der Zelle mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix gesteuert. Diese Interaktion erfolgt durch dynamische Adhäsions-Komplexe, deren Bestandteil Integrin-Tetraspanin Domänen sind, welche zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Kinasen führt, wie zum Beispiel der *focal adhesion kinase* (FAK) [12]. Zunächst sollte untersucht werden ob Tetraspanin 1 Einfluss auf die Adhäsionseigenschaften von Zervixkarzinomzellen nimmt, um mögliche Hinweise auf verantwortliche äußere Faktoren der beobachteten erhöhten Invasivität zu finden. Dazu wurden Adhäsionsversuche auf den extrazelluläre Matrix Komponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ I sowie III mit SiHa, in Abhängigkeit von Tetraspanin 1, durchgeführt. Dabei konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten der Zelllinie in Abhängigkeit der Tetraspanin 1 Expression festgestellt werden (Abbildung 16, Seite 63). Frühere Studien zur Adhäsion in Verbindung mit Tetraspaninen, ergaben gegensätzliche Ergebnisse in Abhängigkeit des entsprechenden Tetraspanins. Während die Expression von CD9 in der Kolonkarzinomzelllinie Colo320 und die Expression von CD82 in den Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-6 und OVCAR-3 eine verstärkte Integrin-abhängige Adhäsion aufzeigte [117, 132], wurde die Bindung zu Fibronectin und Laminin in der Prostatakarzinomzelllinie Du145 nach CD82 Expression reduziert. Dabei zeigte sich eine verstärkte Internalisierung von α_6 Integrin, welches an der Laminin-Bindung beteiligt ist [58, 90]. Als Ursache für die verstärkte Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinomzellen kann somit eine durch Tetraspanin 1 veränderter Zell-Matrix-Interaktion, an die Komponenten Fibronectin, Laminin sowie Kollagen Typ I und III, ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen ob die Remodulierung des Zytoskeletts über die Integrin *outside-in* Signaltransduktion durch Tetraspanin 1 beeinflusst wird, und darin die Ursache für die erhöhte Invasivität liegt, wurden die zentralen Signalmoleküle *focal adhesion kinase* (FAK), Paxillin und die Protein Kinase B (Akt/PKB) untersucht. Sie spielen eine Rolle in der Aktivierung der *Ras homolog gene family* (Rho) GTPase Familie welche den Umbau des Zytoskeletts steuern (siehe Kapitel 1.6.2, Seite 18 und Abbildung 10, Seite 19). Dazu wurden SiHa Zellen jeweils mit den Bestandteilen der extrazellulären Matrix Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ I und III stimuliert und der Phosphorylierungsstatus der *focal adhesion kinase*, Paxillin, und Akt/PKB, als stromabwärts der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) liegendes Signalprotein, untersucht. Auch hierbei konnten keine Tetraspanin 1 abhängigen Unterschiede in der Phosphorylierung der einzelnen Proteine festgestellt werden (Abbildung 17, Seite 65). Für andere Tetraspanine konnte eine veränderte Integrin-Signaltransduktion nachgewiesen werden. So zeigte die Mamma-

karzinomzelllinie MDA-MB-231 nach unterdrückter CD151 Expression und Stimulation mittels Laminin eine, mit Ausnahme des Tyrosinrest 925, erniedrigte FAK Phosphorylierung. Nach Stimulation mit MatrigelTM konnte eine erniedrigte Aktivierung der GTPase *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) festgestellt werden wobei die Akt/PKB Phosphorylierung unbeeinflusst blieb [187]. Für die Fibroblast Zelllinie Rat-1 konnte in Abhängigkeit von CD151 nach Laminin Stimulation kein Einfluss auf die FAK Phosphorylierung, jedoch ein negativer Effekt auf die Aktivierung der GTPase *Rat sarcoma* (Ras) sowie die Phosphorylierung von Akt/PKB und die Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) Erk1/2 gezeigt werden [137]. Der Integrin-vermittelte Umbau des Zytoskeletts, zur veränderten Zellbeweglichkeit, über FAK, Paxillin und den PI3-Kinase Signalweg können im Fall von Tetraspanin 1 in Zervixkarzinomzellen ausgeschlossen werden. Weder eine Veränderung der *focal adhesion kinase* Aktivität noch des Adapterproteins Paxillin sowie des PI3-Kinase Weges, gezeigt durch Akt/PKB, stehen im Zusammenhang mit der beobachteten Steigerung der Invasion. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig um die Aktivität der GTPasen der Rho Familie zu überprüfen und damit mögliche alternative Regulationsmechanismen der Rho GTPasen. Weiterhin könnte die gesteigerte Invasivität durch Wachstumsfaktoren ausgelöst werden, beziehungsweise über die von Tetraspaninen gebildeten Mikrodomänen wie gezeigt am Beispiel der Interaktion von Tetraspanin 1, was über den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor (Midkin) mit den Integrin Untereinheiten α_6 und β_1 interagiert. Die Signaltransduktion über FAK und Paxillin führte zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT1) und zu einer erhöhten Migration und Invasion der Plattenepithelkarzinomzelllinie der Hals- und Kopfregion, 029 HNSCC (*human head and neck squamous cell carcinoma*) [65]. Darüber hinaus kann eine Regulation der Zellproliferation durch Integrin-vermittelte Signalweiterleitung über den MAP-Kinaseweg potentiell ausgeschlossen werden da die dafür nötige Phosphorylierung des Tyrosin 925 der *focal adhesion kinase* unbeeinflusst blieb (Abbildung 17, Seite 65), dies sollte jedoch durch weiteren Experimenten belegt werden.

Im Gegensatz zur beobachteten Erhöhung der Invasivität durch Tetraspanin 1 steht eine gefundene Verminderung der Expression der Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14, MT1-MMP) auf RNA- und Proteinebene. Hierzu wurden Expressionsanalysen der 23 bekannten humanen MMPs mittels PCR durchgeführt, sowie für ausgewählte MMPs mittels Immundetektion von Zelllysaten sowie immunhistochemische Färbung von Biopsiematerial von Neoplasien und Zervixkarzinomen. Neben der reduzierten Genexpression (Daten nicht gezeigt) konnte weiterhin eine Verminderung der inaktiven sowie aktivierten Form von MMP14 bei SiHa in Abhängigkeit von Tetraspanin 1 gezeigt werden (Abbildung 18, Seite 66). Die Expression von MMP14 in den untersuchten Geweben zeigte jedoch keine Tetraspanin 1 abhängige Veränderung, was sich jedoch aufgrund nicht auszuschließender unspezifischer Reaktionen des verwendeten Antikörpers nur schlecht beurteilen lässt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass eine Ex-

pression von MMP14 in HeLa Zellen, welche normalerweise keine MMP14 exprimieren, eine erhöhte Migration auf Fibronectin, durch dessen Degradation und damit verminderte fokale Adhäsion, zur Folge hat. In der Fibrosarkomzelllinie HT1080 bewirkte eine Inhibition von MMP14 zu einer verstärkten Phosphorylierung von FAK und Akt/PKB sowie einer verminderten Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 [164]. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde nach ausschalten der Expression der Tetraspanine CD9, CD81 und Tspan2 eine reduzierte MMP14 Aktivität gezeigt, die mit einer verminderten Invasivität und Koloniebildung in Fibronectin- und Kollagengelen einherging [88]. Die gefundene Verminderung der Expression der Matrix Metalloproteinase 14 steht im Gegensatz zur erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender SiHa Zellen. Aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten ist es jedoch nötig den gefundenen Effekt auf die MMP14 Expression zu bestätigen oder zu widerlegen.

Um weitere mögliche Beteiligungen von Tetraspanin 1 an wichtigen Zellfunktionen zu untersuchen, wurden Proliferationsversuche durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Proliferation der adhärent wachsenden Zelllinien SiHa und HeLa in Abhängigkeit von Tetraspanin 1 untersucht. Über 72 Stunden hinweg wurden keine Unterschiede im Proliferationsverhalten festgestellt (Daten nicht gezeigt) eine nähere Betrachtung wurde für die Zelllinie SiHa nach 6 Stunden durchgeführt welche die vorangegangene Beobachtung bestätigten, das Tetraspanin 1 exprimierende Zellen keine erhöhte oder reduzierte Proliferation aufzeigten (Abbildung 19, Seite 68). Um die Tumorzell-eigene, Verankerungs-unabhängige Proliferation, oder *in vitro* Tumorbildung, zu untersuchen, wurden Kolonie Formations Assays durchgeführt. Auch hierbei wurden keine Tetraspanin 1 abhängigen Unterschiede der Tetraspanin 1 exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen hinsichtlich der Anzahl und Größe der gebildeten Kolonien festgestellt (Abbildung 20, Seite 69). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, wurden bei der Haut-Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 sowie Kolonkarzinomzelllinie HCT-8 nach verminderter Tetraspanin 1 Expression, eine reduzierte Proliferation festgestellt [29, 30]. Des weiteren wurde nach Antikörper Blockierung des Tetraspanins CD9 bei verschiedenen Tumorzelllinien eine verminderte Proliferation gezeigt, darunter die Magenkarzinomzelllinien MKN28 und MKN-45, die Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2, die Lungenkarzinomzelllinie A459 und die Kolonkarzinomzelllinien SW480, HT-29, Caco-2 [102] und Colo320 [117] oder auch nicht Karzinomzellen wie Endothelzellen [83]. Für das Tetraspanin CD151 wurde in der Brustepithelzelllinie HB2 (keine Karzinomzelllinie) eine verminderte Proliferation, beziehungsweise Koloniebildung, *in vitro* und *in vivo* im Xenograft Modell gezeigt, nachdem die CD151 Expression vermindert wurde [111]. Für die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 konnte nach CD151 Depletion *in vitro* kein Einfluss auf die Koloniebildung beobachtet werden, jedoch zeigte sich *in vivo* ebenfalls eine verminderte Tumorbildung [187, 133]. Diese Ergebnisse zeigen das Tetraspanine die Zellproliferation beeinträchtigen können, sich *in vitro* Modelle aber von *in vivo* Modellen unterscheiden können. Die Frage inwiefern Tetraspanin 1 die Tumorbildung von Zervixkarzinomzellen in le-

benden Organismen beeinflusst, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Das Tetraspanin 1 nicht an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist, deutete das vorangegangene Ergebnis hinsichtlich der Integrin-vermittelten Signaltransduktion an. Die unveränderte Phosphorylierung des Tyrosin 925 der *focal adhesion kinase* in Abhängigkeit von Tetraspanin 1 (Abbildung 17, Seite 65), könnte darauf hindeuten, dass ebenfalls der daran anschließende MAP-Kinase Signalweg, und damit die Regulation der Zellproliferation, ebenfalls unbeeinflusst sind. Jedoch wurde im Fall der durchgeführten Proliferationsversuche keine Stimulation über Komponenten der extrazellulären Matrix durchgeführt, sondern durch die im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren. Aus diesem Grund sind zur Überprüfung der Regulation der Proliferation über Integrin-vermittelte Signalweiterleitung weitere Experimente erforderlich.

Wie bereits, im Rahmen der durchgeführten Proliferationsversuche, angesprochen, wird eine weitere Möglichkeit zur Steuerung der Zellproliferation durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermittelt. Nach Stimulation mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) wurde die Aktivierung des EGF-Rezeptor sowie die Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges anhand der Signalproteine Ras und Erk1/2 untersucht. In Abhängigkeit von Tetraspanin 1 konnten keine Unterschiede in der Aktivierung der untersuchten Signalmoleküle festgestellt werden (Abbildung 21, Seite 70) was das Ergebnis, das Tetraspanin 1 keinen Einfluss auf die Proliferation der untersuchten Zervixkarzinomzelllinien hat, auf Ebene der Signaltransduktion bestätigt.

Über die Stimulation mit EGF wird jedoch nicht nur die Zellproliferation sondern auch die Zellbeweglichkeit in Zervixkarzinomzellen reguliert, wie am Beispiel der zervikalen Adenokarzinomzelllinie OMC-4 gezeigt wurde [171]. Für die humane Brustepithelzelllinie HB2 hingegen, konnte eine verminderte Migration nach EGF Stimulation in Abhängigkeit von CD82 festgestellt werden. Es wurde gezeigt das CD82 zum EGF-Rezeptor colokalisiert und dessen Phosphorylierung nach EGF-Stimulation, im Vergleich zu den CD82 negativen HB2, reduziert war. Diese negative Beeinflussung des EGF-Rezeptors setzte sich in der anschließenden Signalkaskade fort und führte zu einer verminderten Aktivierung von Ras und einem Ausbleiben der Lamellopodienbildung was zu einer Reduktion der Zellbeweglichkeit führte [112]. Inwiefern Wachstumsfaktoren an der Erhöhten Invasivität Tetraspanin 1 exprimierender Zervixkarzinom Zellen beteiligt sind und welche Signalwege dabei involviert sind, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Daraus ergibt sich weiterhin das die Integrin-vermittelte Aktivierung des MAP-Kinase Weges ebenfalls Einfluss auf die Zellbeweglichkeit haben könnte. Was jedoch aufgrund der unveränderten Phosphorylierung des Tyrosin 925 der *focal adhesion kinase* nach Bindung von Fibronektin, Laminin sowie der Kollagen Typen I und III, hier, nicht der verantwortliche Steuermechanismus zu sein scheint.

Auch wenn die, für die gesteigerte Invasivität, verantwortlichen Mechanismen noch nicht aufgeklärt sind, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Tetraspanin 1 exprimierende Zervixkarzinomzellen eine erhöhte Invasivität aufweisen, was das Risikopotential Tetra-

spanin 1 positiver Tumore möglicherweise erhöht. Da Tetraspanin 1 verstärkt in schwergradigen Neoplasien exprimiert wird und mit der Zervixkarzinogenese assoziiert zu sein scheint, stellt es einen potentiellen molekularen Marker für die Zervixkarzinomvorsorge dar. In weiteren Untersuchungen sollten die Mechanismen der durch Tetraspanin 1 ausgelösten Steigerung der Invasivität aufgeklärt, sowie Testverfahren entwickelt werden um die Tauglichkeit von Tetraspanin 1 als molekularen Marker in der Diagnostik überprüfen zu können.

7 Ausblick

Ziele dieser Arbeit waren die Entwicklung eines Nachweisverfahrens und Charakterisierung von potentiellen molekularen Markern in der Zervixkarzinom Vorsorge, die die derzeitig angewandten diagnostischen Methoden hinsichtlich ihres Vorhersagewertes verbessern können.

Das Onkoprotein E7 des humanen Papillomavirus Typ 45 (HPV45) ist hauptsächlich verantwortlich für die Transformation der infizierten zervikalen Epithelzellen. Der entwickelte *Sandwich*-ELISA konnte aufgrund der geringen Anzahl an HPV45 positiver Proben, unter denen nur zwei zervikale intraepitheliale Neoplasien waren, nicht hinreichend auf eine klinische Anwendbarkeit als diagnostischer Test geprüft werden. Es ist erforderlich das Testsystem mit einer größeren Probenzahl, hinsichtlich HPV45 positiver Proben, zu validieren um den potentiellen Nutzen als Diagnosesystem zu bestätigen.

Ein weiterer potentieller Kandidat als molekularer Marker für die Zervixkarzinomvorsorge ist das Transmembranprotein Tetraspanin 1. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden das Tetraspanin 1 bei Zervixkarzinomzellen zwar keinen Einfluss auf die Proliferation, jedoch eine verstärkte Invasivität hervorruft. Die Analyse möglicher Signaltransduktionswege die an dem für Zellbewegung erforderlichem Umbau des Zell-Zytoskeletts beteiligt sind ergab, das weder die durch EGF-vermittelte Aktivierung von Ras, noch die Integrin-vermittelte Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK), Paxillin und Akt (über die PI3-Kinase) an der beobachteten Invasivitätssteigerung beteiligt sind.

In zukünftigen Versuchen könnten, wie bereits angesprochenen, weitergehende Untersuchungen des MAP-Kinase Signalweges nach Stimulation über Integrine sowie des PI3-Kinase Weges nach EGF-Stimulation durchgeführt werden. Darüber hinaus kann der Einfluss des Transformierenden Wachstums Faktor-alpha (TGF- α) hinsichtlich der Stimulation über den EGF-Rezeptor untersucht werden, oder die Aktivität verschiedener GTPasen (Ras, Rac, Rho, cdc42), nach Integrin-vermittelter Signaltransduktion, weiteren Aufschluss über die Rolle von Tetraspanin 1 bei der Invasivität von Zervixkarzinomzellen liefern. Für die Stimulation mit dem TGF- α über den EGF-Rezeptor wurde in der Hunde-Nieren-Zelllinie MDCK gezeigt, dass CD9 unter anderem Einfluss auf die Lokalisation von TGF- α in der Zellmembran zu Zell-Kontakt Regionen nimmt und dadurch die Aktivität der GTPasen RhoA und Rac1 verändert wird, was in einer verminderten Migrationsfähigkeit der Zellen resultiert [69]. Weitere mögliche Signalproteine die eine Rolle spielen könnten, sind möglicherweise die c-Jun N-terminal Kinase (JNK), die infolge von EGF Stimulation durch die *focal adhesion kinase* aktiviert wird, danach Paxillin aktivieren kann und demzufolge am Prozess der Zellbeweglichkeit beteiligt ist [63, 56], sowie Ephrine. Ephrine sind Zell-Zell-Kontakt Proteine, sie sind membranständig und sind Liganden der Ephrin-Rezeptor Tyrosin Kinasen (Eph-RTKs). Sie sind beteiligt an Integrin-vermittelter Adhäsion, Zellmigration und -invasion, indem sie Signale über FAK und JNK induzieren [67, 97, 107]. Die Aufklärung der verantwortlichen Mechanismen,

für die Erhöhung der Invasivität von Zervixkarzinomzellen durch Tetraspanin 1, könnte weitere mögliche Ansatzpunkte für diagnostische Verfahren liefern. Darüber hinaus sollte untersucht werden ob die monoklonalen Antikörper gegen Tetraspanin 1 den beobachteten Effekt unterdrücken können. Dazu könnte ergänzend auf die Zervixkarzinomzelllinien CaSki und MS751 zurückgegriffen werden. Beide Zelllinien exprimieren Tetraspanin 1. Neben dem Einsatz der monoklonalen Antikörper, um möglicherweise die Funktionen von Tetraspanin 1 durch Bindung zu blockieren, könnte die Expression mittels siRNA unterdrückt werden und somit weitere Anhaltspunkte über den Einfluss von Tetraspanin 1 in Zervixkarzinomzellen gewonnen werden.

Durch die hier gezeigte Beteiligung von Tetraspanin 1 an der Invasivität von Zervixkarzinomzellen, sowie seiner Expression in präkanzerösen Vorstufen, ist Tetraspanin 1 ein potentiell geeignetes Markerprotein für die Diagnostik und möglicherweise auch zur Beurteilung des Metastasierungspotentials geeignet. Neben der angesprochenen weiteren Charakterisierung des Mechanismus über den Tetraspanin 1 die Invasivität beeinflusst, sollten ebenfalls Verfahren zum Nachweis von Tetraspanin 1 in klinischem Probenmaterial entwickelt werden, um die Anwendbarkeit von Tetraspanin 1 als molekularen Marker in der Krebsvorsorge zu testen. Dazu bieten sich die im Labor generierten monoklonalen Antikörper an, welche ebenfalls in ELISA-basierten Verfahren sowie immunhisto- oder immunzytochemischen Methoden an klinischen Proben getestet werden könnten.

8 Zusammenfassung

Das Zervixkarzinom ist die dritt-häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit und weist eine Sterblichkeitsrate von circa 50% auf. Voraussetzung für die Entwicklung des Zervixkarzinoms ist eine persistierende Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV). Die derzeit angewandten Methoden in der Krebsvorsorge, beruhen auf der zytologischen Bewertung der durch Abstriche entnommenen Zellen vom Muttermund und dem Nachweis auf DNA der humanen Papillomaviren, welche hauptverantwortlich für die Entstehung des Zervixkarzinoms sind. Aufgrund des niedrigen positiven Vorhersagewertes dieser Tests für den Nachweis von schwer-gradigen Präkanzerosen (CIN) und Karzinomen, ist es erforderlich unterstützende Nachweisverfahren für aussagekräftige molekulare Marker zu entwickeln. Dafür könnte sich der Nachweis der viralen Onkoproteine anbieten. Es wurde ein *Sandwich*-ELISA Verfahren zum Nachweis des humanen Papillomavirus Typ 45 (HPV45) Onkoproteins E7, auf der Basis von neu generierten monoklonalen Antikörpern, entwickelt. Mithilfe dieses Tests konnte das E7 Protein aus Zelllinien sowie Gewebematerial von Zervixkarzinomen nachgewiesen werden. Weiterhin wurden 223 Zelllysate, aus Zell-Abstrichen der Endo- und Ektozervix, untersucht. Dabei wurde eine von zwei Frauen mit HPV45 positiven leicht-gradigen CIN richtig erkannt aber auch fünf HPV-negative Frauen sowie zwei Frauen mit einem anderen HPV-Typ. Daraus resultiert, hinsichtlich der HPV-DNA-Bestimmung als Referenz Methode, eine Spezifität von 96,8% sowie eine Sensitivität von 14,3%. Hinsichtlich der histologisch positiven Befunde als Referenz, ergab sich eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 50%. Dieses Ergebnis impliziert, dass durch den Nachweis des E7 Proteins, anstelle von HPV-DNA, ein höherer positiver Vorhersagewert in der Krebsvorsorge erzielt werden kann. Aufgrund der geringen Anzahl HPV45 positiver Proben ist die Validierung des entwickelten *Sandwich*-ELISA jedoch noch nicht abgeschlossen.

Neben dem viralen Onkoprotein E7 ist das Transmembranprotein Tetraspanin 1 ein weiteres potentiell Markerprotein. Tetraspanin 1 wird in einer Subgruppe schwer-gradiger CIN sowie in Zervixkarzinomen überexprimiert. Um die Rolle von Tetraspanin 1 als Markerprotein zu prüfen sollte es im Hinblick auf die Zervixkarzinogenese näher charakterisiert werden. Dazu dienten die Zervixkarzinomzelllinien SiHa und HeLa als Modell. In immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebematerial zeigte sich eine verstärkte Expression von Tetraspanin 1 in Zellen der Wachstumsfront einiger schwer-gradiger Neoplasien und Zervixkarzinome. Durch Invasionsversuche konnte gezeigt werden, dass Tetraspanin 1 eine gesteigerte Invasivität, beider Zervixkarzinomzelllinien, verursacht. Eine Veränderung der Zell-Matrix-Adhäsion in Abhängigkeit von Tetraspanin 1 konnte jedoch ausgeschlossen werden. Um die genauen Mechanismen für die erhöhte Invasivität zu untersuchen, wurden die Signalproteine *focal adhesion kinase* (FAK), Paxillin und die Protein Kinase B (Akt/PKB) im Rahmen der Integrin-vermittelte Signaltransduktion untersucht. Jedoch konnten keine Veränderungen im Phosphorylierungsstatus festgestellt

werden, was eine Steuerung der Invasion durch Tetraspanin 1 über diese Signalproteine ausschließt. Entgegen der gesteigerten Invasivität durch Tetraspanin 1 wurde eine verminderte Expression der Matrix Metalloproteinase MMP14 festgestellt, dieses Ergebnis muss jedoch, aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen, in weiteren Untersuchungen noch bestätigt werden. Neben dem Einfluss von Tetraspanin 1 bei der Zellinvasion, wurde ebenfalls eine mögliche Beteiligung an der Zellproliferation untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch kein Effekt durch Tetraspanin 1 hinsichtlich adhärenenten sowie Zell-Matrix-Kontakt unabhängigen Wachstums. Durch Untersuchung des Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweges über den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) wurde dieses Ergebnis auf Signaltransduktionsebene bestätigt. Auch wenn Tetraspanin 1 die Zellproliferation nicht beeinflusst, ist es mit der Zervixkarzinogenese assoziiert da es die Invasivität von Zervixkarzinomzellen erhöht. Weiterhin wird Tetraspanin 1 in einer Subgruppe schwer-gradiger, präkanzeröser Vorstufen verstärkt exprimiert. Aus diesen Gründen könnte Tetraspanin 1, als zelluläres Protein, einen weiteren molekularen Marker für die Krebsvorsorge des Zervixkarzinoms darstellen.

Eine Steigerung der Spezifität und somit des positiven Vorhersagewertes in der Krebsvorsorge durch den Nachweis des viralen Onkoproteins E7 in Zellabstrichen erscheint realisierbar und könnte eventuell durch Tetraspanin 1 als nicht-viraler Marker weiter verbessert werden.

9 Abstract

Cervical cancer is the third most common cancer among women worldwide and has a mortality of about 50%. Persistent infection with high-risk human papillomaviruses is a prerequisite for the development of cervical cancer. Currently used methods for primary cervical cancer screening are based on cytology and HPV-DNA detection. Owing to the low positive prediction value of these tests for the detection of precancers (CIN2 and 3) and cancer we aim to develop novel screening tests based on new molecular markers. Therefore we generated monoclonal antibodies and established a Sandwich-ELISA for the detection of the human papillomavirus type 45 (HPV45) oncoprotein E7. This test detects the HPV45 E7 protein in lysates from cervical cancer cell line and cervical cancer tissue. Furthermore lysates from 223 cervical smears were analysed. One of two patients with HPV45 positive low grade CIN, but also five women who were HPV-negative and two women with other HPV-types were detected. Consequently, the Sandwich-ELISA revealed a specificity of 96.8% and a sensitivity of 14.3% in comparison with HPV-genotyping as the reference method. Regarding the histology the Sandwich-ELISA revealed a specificity of 100% and a sensitivity of 50%. This data implies that the detection of the HPV oncoprotein E7 instead of HPV DNA may have a higher positive predictive value in a screening setting. Because of the low number of HPV45 positive specimens the validation of the assay is not yet finalized.

In addition to HPV45 E7 the transmembrane protein tetraspanin 1 may also be a suitable molecular marker for the detection of CIN and cancers. Tetraspanin 1 is overexpressed in a subgroup of high grade CIN and cervical cancer. To characterise the role of tetraspanin 1 in cervical carcinogenesis the cervical cancer cell lines SiHa and HeLa were used. Immunohistological analyses have shown overexpression of tetraspanin 1 at the growth front of high-grade neoplasia and cervical cancers. Invasion assays revealed an increased invasiveness of HeLa and SiHa after ectopic expression of tetraspanin 1. Tetraspanin 1 dependent changes in adhesion to extracellular matrix components could be excluded. To elucidate the mechanisms contributing to increased invasion, the integrin-mediated activation of focal adhesion kinase (FAK), paxillin and protein kinase B (Akt/PKB) was analysed. No tetraspanin 1 dependent alterations in integrin-mediated signalling were found. In contrast to the increased invasion due to tetraspanin 1 overexpression, a decreased expression of matrix metalloproteinase 14 (MMP14) was noted. Owing to the limited number of experiments these result must be confirmed. Furthermore the influence of tetraspanin 1 on cell proliferation was analysed. Tetraspanin 1 had no effect on adherent or cell-matrix-contact independent cell growth. This was confirmed by analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, which were also unaffected by tetraspanin 1. Even though cell proliferation is not affected by tetraspanin 1, its expression does increase cell invasion. Moreover, since the protein is strongly expressed in a subgroup of CIN2 and 3 and in most cancers, it is a

further candidate molecular marker for cervical cancer screening.

Literaturverzeichnis

- [1] W. al Saleh, P. Delvenne, R. Greimers, V. Fridman, J. Doyen, and J. Boniver. Assessment of ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. correlation with the histologic grade and human papillomavirus type. *Am J Clin Pathol*, 104(2):154–160, Aug 1995.
- [2] N. Alam, H. L. Goel, M. J. Zarif, J. E. Butterfield, H. M. Perkins, B. G. Sansoucy, T. K. Sawyer, and L. R. Languino. The integrin-growth factor receptor duet. *J Cell Physiol*, 213(3):649–653, Dec 2007.
- [3] R. C. Allsopp and C. B. Harley. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*, 219(1):130–136, Jul 1995.
- [4] E. Andersson, C. K  rberg, T. R  dberg, L. Blomqvist, B.-M. Zetterqvist, W. Ryd, M. Lindh, and P. Horal. Type-specific hpv e6/e7 mrna detection by real-time pcr improves identification of cervical neoplasia. *J Clin Microbiol*, Sep 2011.
- [5] J. Ang, B.-L. Fang, L. K. Ashman, and A. G. Frauman. The migration and invasion of human prostate cancer cell lines involves cd151 expression. *Oncol Rep*, 24(6):1593–1597, Dec 2010.
- [6] J. Ang, M. Lijovic, L. K. Ashman, K. Kan, and A. G. Frauman. Cd151 protein expression predicts the clinical outcome of low-grade primary prostate cancer better than histologic grading: a new prognostic indicator? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(11 Pt 1):1717–1721, Nov 2004.
- [7] A. Balasubramanian, J. Hughes, C. Mao, R. Ridder, M. Herkert, N. B. Kiviat, and L. A. Koutsky. Evaluation of an elisa for p16ink4a as a screening test for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(11):3008–3017, Nov 2009.
- [8] H. Bao and Y. Wu. p16ink4a and ki-67 immunostaining on cell blocks from residual thinprep material is helpful in identifying significant preneoplastic cervical lesions. *Pathol Res Pract*, 207(4):216–219, Apr 2011.
- [9] R. Bari, Y. H. Zhang, F. Zhang, N. X. Wang, C. S. Stipp, J. J. Zheng, and X. A. Zhang. Transmembrane interactions are needed for kai1/cd82-mediated suppression of cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol*, 174(2):647–660, Feb 2009.
- [10] R. A. Bascom, S. Manara, L. Collins, R. S. Molday, V. I. Kalnins, and R. R. McInnes. Cloning of the cdna for a novel photoreceptor membrane protein (rom-1) identifies a disk rim protein family implicated in human retinopathies. *Neuron*, 8(6):1171–1184, Jun 1992.
- [11] F. Berditchevski, G. Bazzoni, and M. E. Hemler. Specific association of cd63 with the vla-3 and vla-6 integrins. *J Biol Chem*, 270(30):17784–17790, Jul 1995.
- [12] F. Berditchevski and E. Odintsova. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol*, 146(2):477–492, Jul 1999.
- [13] F. Berditchevski, E. Odintsova, S. Sawada, and E. Gilbert. Expression of the palmitoylation-deficient cd151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin

- with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem*, 277(40):36991–37000, Oct 2002.
- [14] F. Berditchevski, K. F. Tolias, K. Wong, C. L. Carpenter, and M. E. Hemler. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (cd63 and cd81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem*, 272(5):2595–2598, Jan 1997.
- [15] F. Berditchevski, M. M. Zutter, and M. E. Hemler. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (tm4 proteins). *Mol Biol Cell*, 7(2):193–207, Feb 1996.
- [16] J. S. Biscardi, M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, and S. J. Parsons. c-src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyr845 and tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*, 274(12):8335–8343, Mar 1999.
- [17] C. Boucheix, P. Benoit, P. Frachet, M. Billard, R. E. Worthington, J. Gagnon, and G. Uzan. Molecular cloning of the cd9 antigen. a new family of cell surface proteins. *J Biol Chem*, 266(1):117–122, Jan 1991.
- [18] S. N. Boyer, D. E. Wazer, and V. Band. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 56(20):4620–4624, Oct 1996.
- [19] N. W. J. Bulkman, J. Berkhof, L. Rozendaal, F. J. van Kemenade, A. J. P. Boeke, S. Bulk, F. J. Voorhorst, R. H. M. Verheijen, K. van Groningen, M. E. Boon, W. Ruitinga, M. van Ballegooijen, P. J. F. Snijders, and C. J. L. M. Meijer. Human papillomavirus dna testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*, 370(9601):1764–1772, Nov 2007.
- [20] M. B. Calalb, T. R. Polte, and S. K. Hanks. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15(2):954–963, Feb 1995.
- [21] V. Carloni, A. Mazzocca, and K. S. Ravichandran. Tetraspanin cd81 is linked to erk/mapkinase signaling by shc in liver tumor cells. *Oncogene*, 23(8):1566–1574, Feb 2004.
- [22] L. A. Cary, J. F. Chang, and J. L. Guan. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with src and fyn. *J Cell Sci*, 109 (Pt 7):1787–1794, Jul 1996.
- [23] L. A. Cary, D. C. Han, T. R. Polte, S. K. Hanks, and J. L. Guan. Identification of p130cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol*, 140(1):211–221, Jan 1998.
- [24] S. Charrin, S. Manié, M. Oualid, M. Billard, C. Boucheix, and E. Rubinstein. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett*, 516(1-3):139–144, Apr 2002.
- [25] S. P. Chellappan, S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz, and J. R. Nevins. The e2f transcription factor is a cellular target for the rb protein. *Cell*, 65(6):1053–1061, Jun 1991.

- [26] H. C. Chen, P. A. Appeddu, H. Isoda, and J. L. Guan. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 271(42):26329–26334, Oct 1996.
- [27] L. Chen, X. Li, G.-L. Wang, Y. Wang, Y.-Y. Zhu, and J. Zhu. Clinicopathological significance of overexpression of tspan1, ki67 and cd34 in gastric carcinoma. *Tumori*, 94(4):531–538, 2008.
- [28] L. Chen, Z. Wang, X. Zhan, D.-C. Li, Y.-Y. Zhu, and J. Zhu. Association of net-1 gene expression with human hepatocellular carcinoma. *Int J Surg Pathol*, 15(4):346–353, Oct 2007.
- [29] L. Chen, D. Yuan, R. Zhao, H. Li, and J. Zhu. Suppression of tspan1 by rna interference inhibits proliferation and invasion of colon cancer cells in vitro. *Tumori*, 96(5):744–750, 2010.
- [30] L. Chen, Y. Zhu, H. Li, G. Ian Wang, Y. yuan Wu, Y. xiang Lu, J. Qin, J. Tuo, J. li Wang, and J. Zhu. Knockdown of tspan1 by rna silencing and antisense technique inhibits proliferation and infiltration of human skin squamous carcinoma cells. *Tumori*, 96(2):289–295, 2010.
- [31] C. M. Chiang, G. Dong, T. R. Broker, and L. T. Chow. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the e2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol*, 66(9):5224–5231, Sep 1992.
- [32] C. M. Chiang, M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow. Viral e1 and e2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13):5799–5803, Jul 1992.
- [33] G. Connell, R. Bascom, L. Molday, D. Reid, R. R. McInnes, and R. S. Molday. Photoreceptor peripherin is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(3):723–726, Feb 1991.
- [34] G. Coquillard, B. Palao, and B. K. Patterson. Quantification of intracellular hpv e6/e7 mrna expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to hpv dna. *Gynecol Oncol*, 120(1):89–93, Jan 2011.
- [35] L. Coussens, T. L. Yang-Feng, Y. C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, and U. Francke. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to egf receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230(4730):1132–1139, Dec 1985.
- [36] T. P. Cripe, T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid, M. Dürst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 e6-e7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral e2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*, 6(12):3745–3753, Dec 1987.
- [37] J. Cuzick, M. Arbyn, R. Sankaranarayanan, V. Tsu, G. Ronco, M.-H. Mayrand, J. Dillner, and C. J. L. M. Meijer. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*, 26 Suppl 10:K29–K41, Aug 2008.

- [38] J. Cuzick, C. Clavel, K.-U. Petry, C. J. L. M. Meijer, H. Hoyer, S. Ratnam, A. Szarewski, P. Birembaut, S. Kulasingam, P. Sasieni, and T. Iftner. Overview of the european and north american studies on hpv testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*, 119(5):1095–1101, Sep 2006.
- [39] E.-M. de Villiers, C. Fauquet, T. R. Broker, H.-U. Bernard, and H. zur Hausen. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1):17–27, Jun 2004.
- [40] G. W. Demers, C. L. Halbert, and D. A. Galloway. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 e7 gene. *Virology*, 198(1):169–174, Jan 1994.
- [41] L. Diller, J. Kassel, C. E. Nelson, M. A. Gryka, G. Litwak, M. Gebhardt, B. Bressac, M. Ozturk, S. J. Baker, and B. Vogelstein. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol*, 10(11):5772–5781, Nov 1990.
- [42] G. Dong, T. R. Broker, and L. T. Chow. Human papillomavirus type 11 e2 proteins repress the homologous e6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol*, 68(2):1115–1127, Feb 1994.
- [43] J. Doorbar, S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. Specific interaction between hpv-16 e1-e4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352(6338):824–827, Aug 1991.
- [44] N. Dyson, P. Guida, K. Münger, and E. Harlow. Homologous sequences in adenovirus e1a and human papillomavirus e7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol*, 66(12):6893–6902, Dec 1992.
- [45] N. Dyson, P. M. Howley, K. Münger, and E. Harlow. The human papilloma virus-16 e7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243(4893):934–937, Feb 1989.
- [46] D. Ehehalt, B. Lener, H. Pircher, K. Dreier, H. Pfister, A. M. Kaufmann, S. Frangini, S. Ressler, E. Müller-Holzner, M. Schmitt, D. Höfler, U. Rostek, A. Kaiser, A. Widschwendter, W. Zwerschke, and P. Jansen-Dürr. Detection of human papillomavirus type 18 e7 oncoprotein in cervical smears: a feasibility study. *J Clin Microbiol*, 50(2):246–257, Feb 2012.
- [47] A. Ehrhardt, M. D. David, G. R. A. Ehrhardt, and J. W. Schrader. Distinct mechanisms determine the patterns of differential activation of h-ras, n-ras, k-ras 4b, and m-ras by receptors for growth factors or antigen. *Mol Cell Biol*, 24(14):6311–6323, Jul 2004.
- [48] J. M. Escola, M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human b-lymphocytes. *J Biol Chem*, 273(32):20121–20127, Aug 1998.
- [49] F. Fehrmann and L. A. Laimins. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22(33):5201–5207, Aug 2003.

- [50] J. O. Funk, S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. Inhibition of cdk activity and pcna-dependent dna replication by p21 is blocked by interaction with the hpv-16 e7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11(16):2090–2100, Aug 1997.
- [51] L. B. Gatta, A. Berenzi, P. Balzarini, E. Dessy, F. Angiero, G. Alessandri, A. Gambino, P. Grigolato, and A. Benetti. Diagnostic implications of 11, p16, and ki-67 proteins and hpv dna in low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 30(6):597–604, Nov 2011.
- [52] T. Goi, M. Shipitsin, Z. Lu, D. A. Foster, S. G. Klinz, and L. A. Feig. An egf receptor/ral-gtpase signaling cascade regulates c-src activity and substrate specificity. *EMBO J*, 19(4):623–630, Feb 2000.
- [53] J. Gu, Y. Sumida, N. Sanzen, and K. Sekiguchi. Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent rho and rac activation via p130(cas)-crkii-dock180 pathway. *J Biol Chem*, 276(29):27090–27097, Jul 2001.
- [54] M. E. Hagensee, N. Yaegashi, and D. A. Galloway. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the 11 protein alone or by coexpression of the 11 and 12 capsid proteins. *J Virol*, 67(1):315–322, Jan 1993.
- [55] C. L. Halbert, G. W. Demers, and D. A. Galloway. The e7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*, 65(1):473–478, Jan 1991.
- [56] C. R. Hauck, D. J. Sieg, D. A. Hsia, J. C. Loftus, W. A. Gaarde, B. P. Monia, and D. D. Schlaepfer. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res*, 61(19):7079–7090, Oct 2001.
- [57] P. Hawley-Nelson, K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. Hpv16 e6 and e7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 8(12):3905–3910, Dec 1989.
- [58] B. He, L. Liu, G. A. Cook, S. Grgurevich, L. K. Jennings, and X. A. Zhang. Tetraspanin cd82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*, 280(5):3346–3354, Feb 2005.
- [59] M. E. Hemler. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(10):801–811, Oct 2005.
- [60] M. Higashiyama, T. Taki, Y. Ieki, M. Adachi, C. L. Huang, T. Koh, K. Kodama, O. Doi, and M. Miyake. Reduced motility related protein-1 (mrp-1/cd9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 55(24):6040–6044, Dec 1995.
- [61] J. D. Hildebrand, M. D. Schaller, and J. T. Parsons. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell*, 6(6):637–647, Jun 1995.
- [62] H. Hotta, A. H. Ross, K. Huebner, M. Isobe, S. Wendeborn, M. V. Chao, R. P. Ricciardi, Y. Tsujimoto, C. M. Croce, and H. Koprowski. Molecular cloning and

- characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res*, 48(11):2955–2962, Jun 1988.
- [63] C. Huang, Z. Rajfur, C. Borchers, M. D. Schaller, and K. Jacobson. Jnk phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature*, 424(6945):219–223, Jul 2003.
- [64] S. Huang, S. Yuan, M. Dong, J. Su, C. Yu, Y. Shen, X. Xie, Y. Yu, X. Yu, S. Chen, S. Zhang, P. Pontarotti, and A. Xu. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics*, 86(6):674–684, Dec 2005.
- [65] Y. Huang, M. Sook-Kim, and E. Ratovitski. Midkine promotes tetraspanin-integrin interaction and induces fak-stat1alpha pathway contributing to migration/invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(2):474–478, Dec 2008.
- [66] J. M. Huibregtse, M. Scheffner, and P. M. Howley. Localization of the e6-ap regions that direct human papillomavirus e6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, 13(8):4918–4927, Aug 1993.
- [67] U. Huynh-Do, C. Vindis, H. Liu, D. P. Cerretti, J. T. McGrew, M. Enriquez, J. Chen, and T. O. Daniel. Ephrin-b1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci*, 115(Pt 15):3073–3081, Aug 2002.
- [68] M. Illario, V. Amideo, A. Casamassima, M. Andreucci, T. di Matola, C. Miele, G. Rossi, G. Fenzi, and M. Vitale. Integrin-dependent cell growth and survival are mediated by different signals in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(1):260–269, Jan 2003.
- [69] I. Imhof, W. J. Gasper, and R. Derynck. Association of tetraspanin cd9 with transmembrane tgfa1pha confers alterations in cell-surface presentation of tgfa1pha and cytoskeletal organization. *J Cell Sci*, 121(Pt 13):2265–2274, Jul 2008.
- [70] J. H. Jeon, D. M. Shin, S. Y. Cho, K. Y. Song, N. H. Park, H. S. Kang, Y. D. Kim, and I. G. Kim. Immunocytochemical detection of hpv16 e7 in cervical smear. *Exp Mol Med*, 39(5):621–628, Oct 2007.
- [71] S. Jeon, B. L. Allen-Hoffmann, and P. F. Lambert. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol*, 69(5):2989–2997, May 1995.
- [72] D. L. Jones, R. M. Alani, and K. Münger. The human papillomavirus e7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*, 11(16):2101–2111, Aug 1997.
- [73] D. Karunakaran, E. Tzahar, R. R. Beerli, X. Chen, D. Graus-Porta, B. J. Ratzkin, R. Seger, N. E. Hynes, and Y. Yarden. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of ndf and egf receptors: implications for breast cancer. *EMBO J*, 15(2):254–264, Jan 1996.

- [74] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig. Participation of p53 protein in the cellular response to dna damage. *Cancer Res*, 51(23 Pt 1):6304–6311, Dec 1991.
- [75] S. N. Khleif, J. DeGregori, C. L. Yee, G. A. Otterson, F. J. Kaye, J. R. Nevins, and P. M. Howley. Inhibition of cyclin d-cdk4/cdk6 activity is associated with an e2f-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9):4350–4354, Apr 1996.
- [76] A. Khwaja, P. Rodriguez-Viciana, S. Wennström, P. H. Warne, and J. Downward. Matrix adhesion and ras transformation both activate a phosphoinositide 3-oh kinase and protein kinase b/akt cellular survival pathway. *EMBO J*, 16(10):2783–2793, May 1997.
- [77] K. Kitadokoro, D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi. Cd81 extracellular domain 3d structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*, 20(1-2):12–18, Jan 2001.
- [78] R. Klaes, A. Benner, T. Friedrich, R. Ridder, S. Herrington, D. Jenkins, R. J. Kurman, D. Schmidt, M. Stoler, and M. von Knebel Doeberitz. p16ink4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 26(11):1389–1399, Nov 2002.
- [79] R. Klaes, T. Friedrich, D. Spitkovsky, R. Ridder, W. Rudy, U. Petry, G. Dallenbach-Hellweg, D. Schmidt, and M. von Knebel Doeberitz. Overexpression of p16(ink4a) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, 92(2):276–284, Apr 2001.
- [80] R. L. Klemke, S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle, and D. A. Cheresh. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*, 137(2):481–492, Apr 1997.
- [81] R. L. Klemke, J. Leng, R. Molander, P. C. Brooks, K. Vuori, and D. A. Cheresh. Cas/crk coupling serves as a molecular switch for induction of cell migration. *J Cell Biol*, 140(4):961–972, Feb 1998.
- [82] A. J. Klingelhutz, S. A. Foster, and J. K. McDougall. Telomerase activation by the e6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380(6569):79–82, Mar 1996.
- [83] E.-M. Ko, I. Y. Lee, I. S. Cheon, J. Kim, J.-S. Choi, J. Y. Hwang, J. S. Cho, D. H. Lee, D. Kang, S.-H. Kim, and J. Choe. Monoclonal antibody to cd9 inhibits platelet-induced human endothelial cell proliferation. *Mol Cells*, 22(1):70–77, Aug 2006.
- [84] T. V. Kolesnikova, C. S. Stipp, R. M. Rao, W. S. Lane, F. W. Luscinskas, and M. E. Hemler. Ewi-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions. *Blood*, 103(8):3013–3019, Apr 2004.
- [85] K. Konstantinos, S. Marios, M. Anna, K. Nikolaos, P. Efstratios, and A. Paulina. Expression of ki-67 as proliferation biomarker in imprint smears of endometrial carcinoma. *Diagn Cytopathol*, Sep 2011.

- [86] M. H. Kraus, W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu, and S. A. Aaronson. Isolation and characterization of *erbB3*, a third member of the *erbB*/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(23):9193–9197, Dec 1989.
- [87] A. Köhrmann, U. Kammerer, M. Kapp, J. Dietl, and J. Anacker. Expression of matrix metalloproteinases (mmps) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*, 9:188, 2009.
- [88] M. A. Lafleur, D. Xu, and M. E. Hemler. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell*, 20(7):2030–2040, Apr 2009.
- [89] J. Lammerding, A. R. Kazarov, H. Huang, R. T. Lee, and M. E. Hemler. Tetraspanin *cd151* regulates *alpha6beta1* integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13):7616–7621, Jun 2003.
- [90] H.-A. Lee, I. Park, H.-J. Byun, D. Jeoung, Y.-M. Kim, and H. Lee. Metastasis suppressor *kai1/cd82* attenuates the matrix adhesion of human prostate cancer cells by suppressing fibronectin expression and $\beta 1$ integrin activation. *Cell Physiol Biochem*, 27(5):575–586, 2011.
- [91] C. Leptak, S. R. y Cajal, R. Kulke, B. H. Horwitz, D. J. Riese, G. P. Dotto, and D. DiMaio. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the *e5* genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J Virol*, 65(12):7078–7083, Dec 1991.
- [92] N. Longo, M. Yáñez-Mó, M. Mittelbrunn, G. de la Rosa, M. L. Muñoz, F. Sánchez-Madrid, and P. Sánchez-Mateos. Regulatory role of tetraspanin *cd9* in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood*, 98(13):3717–3726, Dec 2001.
- [93] H. T. Maecker, S. C. Todd, and S. Levy. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 11(6):428–442, May 1997.
- [94] W. Maltzman and L. Czyzyk. Uv irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol*, 4(9):1689–1694, Sep 1984.
- [95] C. Mao, A. Balasubramanian, M. Yu, N. Kiviat, R. Ridder, A. Reichert, M. Herkert, M. von Knebel Doeberitz, and L. A. Koutsky. Evaluation of a new p16(*ink4a*) elisa test and a high-risk hpv dna test for cervical cancer screening: results from proof-of-concept study. *Int J Cancer*, 120(11):2435–2438, Jun 2007.
- [96] A. Masellis-Smith, G. S. Jensen, J. G. Seehafer, J. R. Slupsky, and A. R. Shaw. Anti-*cd9* monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-b cell lines by a novel mechanism. *J Immunol*, 144(5):1607–1613, Mar 1990.
- [97] S. Meyer, C. Hafner, M. Guba, S. Flegel, E. K. Geissler, B. Becker, G. E. Koehl, E. Orsó, M. Landthaler, and T. Vogt. Ephrin-b2 overexpression enhances integrin-mediated ecm-attachment and migration of b16 melanoma cells. *Int J Oncol*, 27(5):1197–1206, Nov 2005.

- [98] M. Miyake, M. Koyama, M. Seno, and S. Ikeyama. Identification of the motility-related protein (mrp-1), recognized by monoclonal antibody m31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med*, 174(6):1347–1354, Dec 1991.
- [99] M. Miyake, K. Nakano, Y. Ieki, M. Adachi, C. L. Huang, S. Itoi, T. Koh, and T. Taki. Motility related protein 1 (mrp-1/cd9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Res*, 55(18):4127–4131, Sep 1995.
- [100] M. Miyake, K. Nakano, S. I. Itoi, T. Koh, and T. Taki. Motility-related protein-1 (mrp-1/cd9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res*, 56(6):1244–1249, Mar 1996.
- [101] I. J. Mohr, R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, and M. R. Botchan. Targeting the e1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the e2 transactivator. *Science*, 250(4988):1694–1699, Dec 1990.
- [102] Y. Murayama, J. ichiro Miyagawa, K. Oritani, H. Yoshida, K. Yamamoto, O. Kishida, T. Miyazaki, S. Tsutsui, T. Kiyohara, Y. Miyazaki, S. Higashiyama, Y. Matsuzawa, and Y. Shinomura. Cd9-mediated activation of the p46 shc isoform leads to apoptosis in cancer cells. *J Cell Sci*, 117(Pt 15):3379–3388, Jul 2004.
- [103] N. Murphy, M. Ring, C. C. B. B. Heffron, B. King, A. G. Killalea, C. Hughes, C. M. Martin, E. McGuinness, O. Sheils, and J. J. O’Leary. p16ink4a, cdc6, and mcm5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 58(5):525–534, May 2005.
- [104] K. Münger, W. C. Phelps, V. Bubb, P. M. Howley, and R. Schlegel. The e6 and e7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63(10):4417–4421, Oct 1989.
- [105] S. M. Nabokina, S. R. Senthilkumar, and H. M. Said. Tspan-1 interacts with the thiamine transporter-1 in human intestinal epithelial cells and modulates its stability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Aug 2011.
- [106] H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and timp. *Cardiovasc Res*, 69(3):562–573, Feb 2006.
- [107] M. Nakada, E. M. Anderson, T. Demuth, S. Nakada, L. B. Reavie, K. L. Drake, D. B. Hoelzinger, and M. E. Berens. The phosphorylation of ephrin-b2 ligand promotes glioma cell migration and invasion. *Int J Cancer*, 126(5):1155–1165, Mar 2010.
- [108] P. Naucler, W. Ryd, S. Törnberg, A. Strand, G. Wadell, K. Elfgrén, T. Rådborg, B. Strander, B. Johansson, O. Forslund, B.-G. Hansson, E. Rylander, and J. Dillner. Human papillomavirus and papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*, 357(16):1589–1597, Oct 2007.
- [109] M. Nees, E. van Wijngaarden, E. Bakos, A. Schneider, and M. Dürst. Identification of novel molecular markers which correlate with hpv-induced tumor progression. *Oncogene*, 16(19):2447–2458, May 1998.

- [110] R. Nishiuchi, N. Sanzen, S. Nada, Y. Sumida, Y. Wada, M. Okada, J. Takagi, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi. Potentiation of the ligand-binding activity of integrin $\alpha 3 \beta 1$ via association with tetraspanin cd151. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(6):1939–1944, Feb 2005.
- [111] V. Novitskaya, H. Romanska, M. Dawoud, J. L. Jones, and F. Berditchevski. Tetraspanin cd151 regulates growth of mammary epithelial cells in three-dimensional extracellular matrix: implication for mammary ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*, 70(11):4698–4708, Jun 2010.
- [112] E. Odintsova, T. Sugiura, and F. Berditchevski. Attenuation of egf receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin cd82/kai-1. *Curr Biol*, 10(16):1009–1012, Aug 2000.
- [113] O. Ohlenschläger, T. Seiboth, H. Zengerling, L. Briese, A. Marchanka, R. Ramachandran, M. Baum, M. Korbass, W. Meyer-Klaucke, M. Dürst, and M. Görlach. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein e7. *Oncogene*, 25(44):5953–5959, Sep 2006.
- [114] M. A. Olayioye, I. Beuvink, K. Horsch, J. M. Daly, and N. E. Hynes. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by src tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 274(24):17209–17218, Jun 1999.
- [115] J. Olweus, F. Lund-Johansen, and V. Horejsi. Cd53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and b cells. *J Immunol*, 151(2):707–716, Jul 1993.
- [116] R. Oren, S. Takahashi, C. Doss, R. Levy, and S. Levy. Tapa-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*, 10(8):4007–4015, Aug 1990.
- [117] S. Ovalle, M. D. Gutiérrez-López, N. Olmo, J. Turnay, M. A. Lizarbe, P. Majano, F. Molina-Jiménez, M. López-Cabrera, M. Yáñez-Mó, F. Sánchez-Madrid, and C. Cabañas. The tetraspanin cd9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer*, 121(10):2140–2152, Nov 2007.
- [118] K. U. Petry, D. Schmidt, S. Scherbring, A. Luyten, A. Reinecke-Lüthge, C. Bergeron, F. Kommoss, T. Löning, J. Ordi, S. Regauer, and R. Ridder. Triaging pap cytology negative, hpv positive cervical cancer screening results with p16/ki-67 dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*, 121(3):505–509, Jun 2011.
- [119] W. C. Phelps, C. L. Yee, K. Münger, and P. M. Howley. The human papillomavirus type 16 e7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus e1a. *Cell*, 53(4):539–547, May 1988.
- [120] G. D. Plowman, J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer, and M. Shoyab. Ligand-specific activation of her4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5):1746–1750, Mar 1993.
- [121] N. Prenzel, O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart, and A. Ullrich. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, 8(1):11–31, Mar 2001.

- [122] S. Ratnam, F. Coutlee, D. Fontaine, J. Bentley, N. Escott, P. Ghatage, V. Gadag, G. Holloway, E. Bartellas, N. Kum, C. Giede, and A. Lear. Clinical performance of the prectect hpv-proofer e6/e7 mrna assay in comparison with that of the hybrid capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol*, 48(8):2779–2785, Aug 2010.
- [123] S. Ratnam, F. Coutlee, D. Fontaine, J. Bentley, N. Escott, P. Ghatage, V. Gadag, G. Holloway, E. Bartellas, N. Kum, C. Giede, and A. Lear. Aptima hpv e6/e7 mrna test is as sensitive as hybrid capture 2 assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *J Clin Microbiol*, 49(2):557–564, Feb 2011.
- [124] K. S. Ravichandran, U. Lorenz, S. E. Shoelson, and S. J. Burakoff. Interaction of shc with grb2 regulates association of grb2 with msos. *Mol Cell Biol*, 15(2):593–600, Feb 1995.
- [125] S. Ressler, R. Scheiden, K. Dreier, A. Laich, E. Müller-Holzner, H. Pircher, D. Morandell, I. Stein, H.-P. Viertler, F. R. Santer, A. Widschwendter, J. Even, P. Jansen-Dürr, C. Capesius, and W. Zwerschke. High-risk human papillomavirus e7 oncoprotein detection in cervical squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13(23):7067–7072, Dec 2007.
- [126] A. Richardson, R. K. Malik, J. D. Hildebrand, and J. T. Parsons. Inhibition of cell spreading by expression of the c-terminal domain of focal adhesion kinase (fak) is rescued by coexpression of src or catalytically inactive fak: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 17(12):6906–6914, Dec 1997.
- [127] D. J. Riese, T. M. van Raaij, G. D. Plowman, G. C. Andrews, and D. F. Stern. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbb receptor family. *Mol Cell Biol*, 15(10):5770–5776, Oct 1995.
- [128] G. A. Rodrigues, M. Falasca, Z. Zhang, S. H. Ong, and J. Schlessinger. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*, 20(4):1448–1459, Feb 2000.
- [129] B. A. Rous, B. J. Reaves, G. Ihrke, J. A. G. Briggs, S. R. Gray, D. J. Stephens, G. Banting, and J. P. Luzio. Role of adaptor complex ap-3 in targeting wild-type and mutated cd63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, 13(3):1071–1082, Mar 2002.
- [130] E. Rubinstein, F. L. Naour, M. Billard, M. Prenant, and C. Boucheix. Cd9 antigen is an accessory subunit of the vla integrin complexes. *Eur J Immunol*, 24(12):3005–3013, Dec 1994.
- [131] E. Rubinstein, F. L. Naour, C. Lagaudrière-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix. Cd9, cd63, cd81, and cd82 are components of a surface tetraspan network connected to hla-dr and vla integrins. *Eur J Immunol*, 26(11):2657–2665, Nov 1996.
- [132] Z. Ruseva, P. X. C. Geiger, P. Hutzler, M. Kotzsch, B. Lubert, M. Schmitt, E. Gross, and U. Reuning. Tumor suppressor kai1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation. *Exp Cell Res*, 315(10):1759–1771, Jun 2009.

- [133] R. Sadej, H. Romanska, G. Baldwin, K. Gkirtzimanaki, V. Novitskaya, A. D. Filer, Z. Krcova, R. Kusinska, J. Ehrmann, C. D. Buckley, R. Kordek, P. Potemski, A. G. Eliopoulos, E.-N. Lalani, and F. Berditchevski. Cd151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium. *Mol Cancer Res*, 7(6):787–798, Jun 2009.
- [134] K. Saito, T. Oku, N. Ata, H. Miyashiro, M. Hattori, and I. Saiki. A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors. *Biol Pharm Bull*, 20(4):345–348, Apr 1997.
- [135] R. Samir, A. Asplund, T. Tot, G. Pekar, and D. Hellberg. High-risk hpv infection and cin grade correlates to the expression of c-myc, cd4+, fh1t, e-cadherin, ki-67, and p16ink4a. *J Low Genit Tract Dis*, 15(4):280–286, Oct 2011.
- [136] G. Sauer, J. Windisch, C. Kurzeder, V. Heilmann, R. Kreienberg, and H. Deissler. Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of cd9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. *Clin Cancer Res*, 9(17):6426–6431, Dec 2003.
- [137] S. Sawada, M. Yoshimoto, E. Odintsova, N. A. Hotchin, and F. Berditchevski. The tetraspanin cd151 functions as a negative regulator in the adhesion-dependent activation of ras. *J Biol Chem*, 278(29):26323–26326, Jul 2003.
- [138] M. D. Schaller. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20(44):6459–6472, Oct 2001.
- [139] M. Scheffner, J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley. The hpv-16 e6 and e6-ap complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3):495–505, Nov 1993.
- [140] M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley. The e6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63(6):1129–1136, Dec 1990.
- [141] M. R. Schick, V. Q. Nguyen, and S. Levy. Anti-tapa-1 antibodies induce protein tyrosine phosphorylation that is prevented by increasing intracellular thiol levels. *J Immunol*, 151(4):1918–1925, Aug 1993.
- [142] D. D. Schlaepfer, M. A. Broome, and T. Hunter. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-src complex: involvement of the grb2, p130cas, and nck adaptor proteins. *Mol Cell Biol*, 17(3):1702–1713, Mar 1997.
- [143] D. D. Schlaepfer, C. R. Hauck, and D. J. Sieg. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*, 71(3-4):435–478, 1999.
- [144] C.-J. Scholz, C. Kurzeder, K. Koretz, J. Windisch, R. Kreienberg, G. Sauer, and H. Deissler. Tspan-1 is a tetraspanin preferentially expressed by mucinous and endometrioid subtypes of human ovarian carcinomas. *Cancer Lett*, 275(2):198–203, Mar 2009.
- [145] C.-J. Scholz, G. Sauer, and H. Deissler. Glycosylation of tetraspanin tspan-1 at four distinct sites promotes its transition through the endoplasmic reticulum. *Protein Pept Lett*, 16(10):1244–1248, 2009.

- [146] E. Schwarz, U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, and H. zur Hausen. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314(6006):111–114, 1985.
- [147] M. Seigneuret, A. Delaguillaumie, C. Lagaudrière-Gesbert, and H. Conjeaud. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. a partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem*, 276(43):40055–40064, Oct 2001.
- [148] J. W. Sellors, J. G. Schweizer, P. S. Lu, B. Liu, B. H. Weigl, J. F. Cui, R. B. Peck, K. Lewis, J. Lim, M. Howard, C. W. Mahoney, L. McAllister, M. Berard-Bergery, C. Bry, Y. A. Labiad, H. Li, L. Liu, J. Silver, W. Chen, and Y. L. Qiao. Association of elevated e6 oncoprotein with grade of cervical neoplasia using pdz interaction-mediated precipitation of e6. *J Low Genit Tract Dis*, 15(2):169–176, Apr 2011.
- [149] L. A. Selvey, L. A. Dunn, B. Murray, R. W. Tindle, and I. H. Frazer. An elisa capture assay for the e7 transforming proteins of hpv16 and hpv18. *J Virol Methods*, 37(2):119–127, May 1992.
- [150] L. M. Shaw, I. Rabinovitz, H. H. Wang, A. Toker, and A. M. Mercurio. Activation of phosphoinositide 3-oh kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell*, 91(7):949–960, Dec 1997.
- [151] W. Shi, H. Fan, L. Shum, and R. Derynck. The tetraspanin cd9 associates with transmembrane tgf-alpha and regulates tgf-alpha-induced egf receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol*, 148(3):591–602, Feb 2000.
- [152] M. Shigeta, N. Sanzen, M. Ozawa, J. Gu, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi. Cd151 regulates epithelial cell-cell adhesion through pkc- and cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol*, 163(1):165–176, Oct 2003.
- [153] T. Shiomi, V. Lemaître, J. D’Armiento, and Y. Okada. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int*, 60(7):477–496, Jul 2010.
- [154] M. Sho, M. Adachi, T. Taki, H. Hashida, T. Konishi, C. L. Huang, N. Ikeda, Y. Nakajima, H. Kanehiro, M. Hisanaga, H. Nakano, and M. Miyake. Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 79(5):509–516, Oct 1998.
- [155] D. J. Sieg, C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, and D. D. Schlaepfer. Fak integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2(5):249–256, May 2000.
- [156] D. J. Sieg, C. R. Hauck, and D. D. Schlaepfer. Required role of focal adhesion kinase (fak) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*, 112 (Pt 16):2677–2691, Aug 1999.
- [157] P. M. Sincock, G. Mayrhofer, and L. K. Ashman. Localization of the transmembrane 4 superfamily (tm4sf) member peta-3 (cd151) in normal human tissues: comparison with cd9, cd63, and alpha5beta1 integrin. *J Histochem Cytochem*, 45(4):515–525, Apr 1997.

- [158] S. C. Sridhar and C. K. Miranti. Tetraspanin kai1/cd82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-met receptor and src kinases. *Oncogene*, 25(16):2367–2378, Apr 2006.
- [159] I. Stamenkovic. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 10(6):415–433, Dec 2000.
- [160] C. S. Stipp. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med*, 12:e3, 2010.
- [161] C. S. Stipp, T. V. Kolesnikova, and M. E. Hemler. Ewi-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol*, 163(5):1167–1177, Dec 2003.
- [162] T. T. Sun, H. Zhao, J. Provet, U. Aebi, and X. R. Wu. Formation of asymmetric unit membrane during urothelial differentiation. *Mol Biol Rep*, 23(1):3–11, 1996.
- [163] S. W. Sørbye, M. Arbyn, S. Fismen, T. J. Gutteberg, and E. S. Mortensen. Hpv e6/e7 mrna testing is more specific than cytology in post-colposcopy follow-up of women with negative cervical biopsy. *PLoS One*, 6(10):e26022, 2011.
- [164] T. Takino, Y. Watanabe, M. Matsui, H. Miyamori, T. Kudo, M. Seiki, and H. Sato. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res*, 312(8):1381–1389, May 2006.
- [165] P. Tamás, Z. Solti, P. Bauer, A. Illés, S. Sipéki, A. Bauer, A. Faragó, J. Downward, and L. Buday. Mechanism of epidermal growth factor regulation of vav2, a guanine nucleotide exchange factor for rac. *J Biol Chem*, 278(7):5163–5171, Feb 2003.
- [166] J. E. Testa, P. C. Brooks, J. M. Lin, and J. P. Quigley. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (peta-3/cd151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res*, 59(15):3812–3820, Aug 1999.
- [167] F. Thierry and M. Yaniv. The bpv1-e2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the hpv18 regulatory region. *EMBO J*, 6(11):3391–3397, Nov 1987.
- [168] T. Tokuhara, H. Hasegawa, N. Hattori, H. Ishida, T. Taki, S. Tachibana, S. Sasaki, and M. Miyake. Clinical significance of cd151 gene expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 7(12):4109–4114, Dec 2001.
- [169] Y. Tomita, H. Shirasawa, H. Sekine, and B. Simizu. Expression of the human papillomavirus type 6b l2 open reading frame in escherichia coli: L2-beta-galactosidase fusion proteins and their antigenic properties. *Virology*, 158(1):8–14, May 1987.
- [170] Y. Tomita, H. Shirasawa, and B. Simizu. Expression of human papillomavirus types 6b and 16 l1 open reading frames in escherichia coli: detection of a 56,000-dalton polypeptide containing genus-specific (common) antigens. *J Virol*, 61(8):2389–2394, Aug 1987.
- [171] M. Ueda, H. Fujii, K. Yoshizawa, Y. Terai, K. Kumagai, K. Ueki, and M. Ueki. Effects of egf and tgf-alpha on invasion and proteinase expression of uterine cervical adenocarcinoma omc-4 cells. *Invasion Metastasis*, 18(4):176–183, 1998.

- [172] A. Ullrich, L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, and J. Schlessinger. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in a431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309(5967):418–425, 1984.
- [173] G. van de Putte, R. Holm, A. K. Lie, C. G. Tropé, and G. B. Kristensen. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol*, 89(1):140–147, Apr 2003.
- [174] A. Ventura, D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128):661–665, Feb 2007.
- [175] M. A. Voss, N. Gordon, S. Maloney, R. Ganesan, L. Ludeman, K. McCarthy, R. Gornall, G. Schaller, W. Wei, F. Berditchevski, and S. Sundar. Tetraspanin cd151 is a novel prognostic marker in poor outcome endometrial cancer. *Br J Cancer*, 104(10):1611–1618, May 2011.
- [176] K. Vuori, H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for src family kinases. *Mol Cell Biol*, 16(6):2606–2613, Jun 1996.
- [177] J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Muñoz. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1):12–19, Sep 1999.
- [178] C. Wallasch, F. U. Weiss, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing, and A. Ullrich. Heregulin-dependent regulation of her2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with her3. *EMBO J*, 14(17):4267–4275, Sep 1995.
- [179] W.-C. Wang, T.-T. Wu, V. S. Chandan, C. M. Lohse, and L. Zhang. Ki-67 and proexc are useful immunohistochemical markers in esophageal squamous intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol*, 42(10):1430–1437, Oct 2011.
- [180] Y. Wang, G. Blandino, M. Oren, and D. Givol. Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene*, 17(15):1923–1930, Oct 1998.
- [181] B. A. Werness, A. J. Levine, and P. M. Howley. Association of human papillomavirus types 16 and 18 e6 proteins with p53. *Science*, 248(4951):76–79, Apr 1990.
- [182] V. Wollscheid, R. Kühne-Heid, I. Stein, L. Jansen, S. Köllner, A. Schneider, and M. Dürst. Identification of a new proliferation-associated protein net-1/c4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. *Int J Cancer*, 99(6):771–775, Jun 2002.
- [183] C. B. J. Woodman, S. I. Collins, and L. S. Young. The natural history of cervical hpv infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7(1):11–22, Jan 2007.
- [184] I. A. f. R. o. C. World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. human papillomaviruses. volume 90., 2007.

- [185] I. A. f. R. o. C. World Health Organization. Cervical cancer incidence and mortality worldwide in 2008 summary (globocan 2008 (iarc) , section of cancer information (23/10/2011)), 2008.
- [186] M. D. Wright and M. G. Tomlinson. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today*, 15(12):588–594, Dec 1994.
- [187] X. H. Yang, A. L. Richardson, M. I. Torres-Arzayus, P. Zhou, C. Sharma, A. R. Kazarov, M. M. Andzelm, J. L. Strominger, M. Brown, and M. E. Hemler. Cd151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. *Cancer Res*, 68(9):3204–3213, May 2008.
- [188] R. L. Yauch, F. Berditchevski, M. B. Harler, J. Reichner, and M. E. Hemler. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with cd151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell*, 9(10):2751–2765, Oct 1998.
- [189] E. Yonish-Rouach, D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352(6333):345–347, Jul 1991.
- [190] T. Yoshida, T. Sano, T. Kanuma, H. Inoue, T. Itoh, C. Yazaki, M. Obara, and T. Fukuda. Usefulness of cintec® plus p16/ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol*, 55(5):413–420, 2011.
- [191] M. Yáñez-Mó, A. Alfranca, C. Cabañas, M. Marazuela, R. Tejedor, M. A. Ursa, L. K. Ashman, M. O. de Landázuri, and F. Sánchez-Madrid. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules cd81/tapa-1 and cd151/peta-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol*, 141(3):791–804, May 1998.
- [192] K. Zerfass, L. M. Levy, C. Cremonesi, F. Ciccolini, P. Jansen-Dürr, L. Crawford, R. Ralston, and M. Tommasino. Cell cycle-dependent disruption of e2f-p107 complexes by human papillomavirus type 16 e7. *J Gen Virol*, 76 (Pt 7):1815–1820, Jul 1995.
- [193] K. Zerfass, A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein, and P. Jansen-Dürr. Sequential activation of cyclin e and cyclin a gene expression by human papillomavirus type 16 e7 through sequences necessary for transformation. *J Virol*, 69(10):6389–6399, Oct 1995.
- [194] K. Zerfass-Thome, W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz, and P. Jansen-Dürr. Inactivation of the cdk inhibitor p27kip1 by the human papillomavirus type 16 e7 oncoprotein. *Oncogene*, 13(11):2323–2330, Dec 1996.
- [195] X. A. Zhang, A. L. Bontrager, and M. E. Hemler. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase c (pkc) and link pkc to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*, 276(27):25005–25013, Jul 2001.
- [196] X. A. Zhang, A. L. Bontrager, C. S. Stipp, S. K. Kraeft, G. Bazzoni, L. B. Chen, and M. E. Hemler. Phosphorylation of a conserved integrin alpha 3 qpsxxe motif regulates signaling, motility, and cytoskeletal engagement. *Mol Biol Cell*, 12(2):351–365, Feb 2001.

- [197] X. A. Zhang, B. He, B. Zhou, and L. Liu. Requirement of the p130cas-crk coupling for metastasis suppressor kai1/cd82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem*, 278(29):27319–27328, Jul 2003.
- [198] X. A. Zhang, W. S. Lane, S. Charrin, E. Rubinstein, and L. Liu. Ewi2/pgrl associates with the metastasis suppressor kai1/cd82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 63(10):2665–2674, May 2003.
- [199] Z. Zhou, Y.-L. Ran, H. Hu, J. Pan, Z.-F. Li, L.-Z. Chen, L.-C. Sun, L. Peng, X.-L. Zhao, L. Yu, L.-X. Sun, and Z.-H. Yang. Tm4sf3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating adam12m expression. *Clin Exp Metastasis*, 25(5):537–548, 2008.
- [200] A. Zijlstra, J. Lewis, B. Degryse, H. Stuhlmann, and J. P. Quigley. The inhibition of tumor cell intravasation and subsequent metastasis via regulation of in vivo tumor cell motility by the tetraspanin cd151. *Cancer Cell*, 13(3):221–234, Mar 2008.
- [201] S. Zimmermann and K. Moelling. Phosphorylation and regulation of raf by akt (protein kinase b). *Science*, 286(5445):1741–1744, Nov 1999.
- [202] H. zur Hausen. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 92(9):690–698, May 2000.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Professor Matthias Dürst für die Bereitstellung der interessanten Themen, die hervorragende Betreuung und für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Matthias Görlach und Thomas Seiboth für die Bereitstellung des rekombinanten HPV45 E7 Proteins.

Ich danke Dr. Oliver Frey und Katrin Beer-Grondke für die gute Zusammenarbeit zur Generierung der Hybridomzelllinien.

Ich bedanke mich bei Lars Jansen für die gute Zusammenarbeit bei der Immunhistochemie und Immunzytochemie.

Weiter bedanke ich mich bei Dr. Christian Fermér und Maria Lidqvist für die gute Zusammenarbeit zur Antikörpermodifikation und während der gesamten Kooperation im Rahmen des SmartHEALTH Projekts.

Ich bedanke mich ebenfalls bei PD Dr. Ignacio Rubio für die hervorragende Zusammenarbeit, seine Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Dr. Jelena Anacker für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zu den Matrix Metalloproteinasen.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Gynäkologischen Molekularbiologie für die hervorragende Zusammenarbeit und sehr schöne Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich mich bei Professor Frank-D. Böhmer, Professor Werner Reichardt, Professor Claus Liebmann und Professor Helmut Deißler für ihre Unterstützung bedanken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit im Rahmen der Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Weder die vorliegende, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit, wurde als Prüfungsarbeit, für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung, beziehungsweise als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, den 26.03.2012

Sebastian Hölters